

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

FLUORESCENČNÍ ZNAČENÍ KYSELINY HYALURONOVÉ
Ahmad Fehid

Bakalářská práce
2020

UNIVERSITY OF PARDUBICE
FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY

FLUORESCENCE LABELLING OF HYALURONIC ACID

Ahmad Fehid

Bachelor Thesis

2020

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Ahmad Fehid**
Osobní číslo: **C16359**
Studijní program: **B2830 Farmakochemie a medicínální materiály**
Studijní obor: **Farmakochemie a medicínální materiály**
Téma práce: **Fluorescenční značení kyseliny hyaluronové**
Zadávací katedra: **Ústav organické chemie a technologie**

Zásady pro vypracování

1. Vypracovat literární rešerši zaměřenou na fluorescenční značení kyseliny hyaluronové a fluorescenční značky používané k tomuto účelu.
2. Vybrat a připravit fluorescenční značku.
3. Připravit fluorescenční derivát kyseliny hyaluronové její reakcí s připravenou fluorescenční značkou.
4. Měřit UV/Vis absorpční a fluorescenční spektra připravených sloučenin.
5. Vyhodnotit získané výsledky a sepsat bakalářskou práci.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Všechna dostupná chemická literatura.

Vedoucí bakalářské práce: **prof. Ing. Radim Hrdina, CSc.**
Ústav organické chemie a technologie

Datum zadání bakalářské práce: **28. února 2020**
Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2020**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Miloš Sedlák, DrSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2020

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne

Ahmad Fehid

Poděkování:

V této části bych rád poděkoval vedoucímu mé bakalářské práce, prof. Ing. Radimovi Hrdinovi, CSc. za veškeré rady, pomoc a připomínky při zpracování mé závěrečné práce. Také bych srdečně poděkoval Ing. Numanovi Almonasymu, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a pomoc při vypracování této práce. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat celé své rodině, která mě po celou dobu mého studia podporovala.

Anotace:

V této bakalářské práci jsou popsány výsledky dosavadních znalostí získaných z literární rešerše na téma kyseliny hyaluronové a její fluorescenční deriváty; jsou popsány syntézy, vlastnosti a aplikace některých zajímavých fluorescenčních derivátů kyseliny hyaluronové. Vlastní část práce popisuje syntézu fluorescenční značky na bázi pyrenového derivátu a její použití pro roubování hyaluronové kyseliny, jakož i jejich strukturní charakteristiky a UV/Vis absorpční a fluorescenční spektra.

Klíčová slova:

Kyselina hyaluronová, fluorescence, nanočástice, Cy5.5, Bodipy, tetramethyl-rhodamin, PyT, absorpční spektrum, fluorescenční spektrum

Annotation

This bachelor thesis describes the results of previous knowledge obtain from the literature search on the topic of hyaluronic acid and its fluorescent derivatives; the syntheses, properties and applications of some interesting fluorescent derivatives of hyaluronic acid are described. The main part describes the synthesis of a fluorescent label based on a pyrene derivative and its use for grafting hyaluronic acid, as well as their structural characteristics and UV / Vis absorption and fluorescence spectra.

Keywords:

Hyaluronic acid, fluorescence, nanoparticles, Cy5.5, Bodips, tetramethyl-rhodamine, PyT, absorption spectrum, fluorescence spectrum

1	Úvod.....	13
2	Teoretická část	14
2.1	Hyaluronová kyselina (HA).....	14
2.1.1	Obecná charakteristika	14
2.1.2	Chemická struktura	14
2.1.3	Biosyntéza a degradace kyseliny hyaluronové.....	15
2.1.4	Výroba hyaluronové kyseliny	15
2.1.5	Chemické modifikace.....	16
2.1.6	Funkce v organismu a využití	18
2.2	Fluorescence	19
2.2.1	Fluorescenční markery používaných k modifikaci HA.....	20
2.3	Modifikace kyseliny hyaluronové fluorescenčními značkami.	20
2.3.1	Imobilizace povrchu fluorescenčně modifikované kyseliny hyaluronové nanočásticemi zlata	21
2.3.1.1	Kyselina hyaluronová–fluorescein (HA-FITC).....	21
2.3.1.2	Kyselina hyaluronová-Cy5.5 (HA- Cy5.5)	24
2.3.2	Kyselina hyaluronová-tetramethyl-rhodamin (HA-TMR).....	25
2.3.3	Kyselina hyluronová-dipyrrromethen-boron (HA-BODIPY)	26
2.3.3.1	Syntéza BODIPY	27
2.3.3.2	Příprava HA-BODIPY	28
2.3.4	HA-Cypate	28
2.3.4.1	Patentovaná syntéza HA-Cypate	28
2.3.4.2	Hydrofobizace hyaluronanu různými typy řetězců mastných kyselin	31
3	Experimentální část.....	35
3.1	Použité chemikálie.....	35
3.2	Použité přístroje a zařízení	35
3.3	Příprava 2,4-dichlor-6-(1-pyrenyl)-1,3,5-triazinu (PyT) ⁶⁴	36

3.4	Příprava fluorescenčně označené kyseliny hyaluronové (HA-PyT).....	37
4	Výsledky a diskuze	38
4.1	Syntéza.....	38
4.2	Excitační a fluorescenční spektra	42
5	Závěr	45
6	Seznam literatury	46

Seznam ilustrací, schémat, tabulek a grafů:

Obrázek 1. Chemická struktura hyaluronové kyseliny

Obrázek 2. Biosyntetická cesta kyseliny hyaluronové v *S. Zooepidemicus*⁽⁸⁾

Obrázek 3. Jablonského diagram⁽²⁸⁾

Obrázek 4. Chemická struktura HA-FITC

Obrázek 5. Schematické znázornění jednostupňové syntézy FITC – HA – AuNP⁽³³⁾

Obrázek 6. Chemická struktura HA-Fluorescein-O-akrylát

Obrázek 7. Chemická struktura HA-TMR

Obrázek 8. Číslování barviva BODIBY a dipyrromethenu podle IUPAC a používání terminů α -, β - a meso-pozice

Obrázek 9. ATR-FTIR spektra hyaluronanu a jeho připravených derivátů HA-PyT

Obrázek 10. Reprezentativní XRD původního hyluronanu a HA-PyT

Obrázek 11 (a,b). Reprezentativní TG (a) a DTG (b) původního hyaluronanu (HA) a jeho derivátů (HA-PyT)

Obrázek 12. Exitační a absorpční spektra PyT

Obrázek 13. Excitační spektrum HA-PyT1 v tuhé fázi

Obrázek 14. Excitační spektrum PyT v tuhé fázi

Obrázek 15. Fluorescenční spektra PyT a HA-PyT1-3 v tuhé fázi

Schéma 1. Modifikace karboxylové funkční skupiny přípravou amidů

Schéma 2. Modifikace karboxylové funkční skupiny přípravou esterů

Schéma 3. První krok syntézy HA-Fluorescein-O-akrylátu

Schéma 4. Příprava HA-Cy5.5 ⁽⁵³⁾

Schéma 5. Postup Syntézy BODIPY

Schéma 6. Příprava HA-BODIPY

Schéma 7. Syntéza Cypate

Schéma 8. Aktivace jednu ze dvou karboxylových skupin Cypate

Schéma 9. Příprava HA-Cypate

Schéma 10. Příprava HA-NM

Schéma 11. Hydrofobizace hyaluronanu

Schéma 12. Hydrofobizace hyaluronanu kyselinou olejovou

Schéma 13. Hydrofobizace hyaluronanu s vázaným cypate a PEG řetězci kyseliny olejové

Tabulka 1. Přehled použitých chemikálií

Tabulka 2. Použité chemikálie k přípravě modifikované HA-PyT

Tabulka 3. Maxima excitačních a fluorescenčních spekter připravených látek

1 Úvod

Biopolymery jsou přírodní vysokomolekulární organické látky produkované buňkami živých organismů. Biopolymery jsou pro organismus netoxické, většinou biokompatibilní a některé jsou i biodegradabilní, což je jejich velkou výhodou. Nejvyužívanějšími biopolymery jsou chitosan, kolagen, hyaluronan a deriváty celulózy. Vylepšená fluorescenční barviva nyní umožňují dříve nemožné studium buněčných struktur a buněčných procesů. Dostupnost nových fluoroforů dramaticky změnila možnosti analýzy jejich interakcí a citlivé detekce.^(1,2)

Fluorescenční značení je proces, ve kterém jsou fluorescenční značky vázány chemickou vazbou k biomolekulám obsahujícím funkční skupiny, a mohou být tedy vizualizovány fluorescenčním zobrazením; k reakci často dochází přes aminové, hydroxylové nebo karboxylové nebo i přes jiné funkční skupiny. Získané fluorescenční deriváty biopolymerů pak mohou být využity v lékařství, nanotechnologiích nebo v biologii.⁽³⁾

Fluorescenční značky nabízejí mnoho výhod, protože jsou vysoce citlivé i při nízkých koncentracích, jsou stabilní a neinterferují s funkcí cílových molekul. Cílené zobrazení fluorescenčně značených biopolymerů umožňuje jejich sledování in vitro a in vivo. Použití různých fluoroforů ve stejném vzorku může také dovolit současné pozorování několika molekul současně. Nejčastěji používanými fluorofory jsou fluoresceinisothiokyanát (FITC), deriváty rodaminu a kumarin.^(1,2)

Účelem této bakalářské práce je provedení literární rešerše na téma fluorescenční značení hyaluronové kyseliny a na základě získaných poznatků syntéza fluorescenční značky 2,4-dichloro-6-(pyren-1-yl)-1,3,5-triazine (PyT) a její použití k značení kyseliny hyaluronové. Dále pak měření spektrálních vlastností tohoto nového fluorescenčního polymeru v závislosti na množství použité značky.

2 Teoretická část

2.1 Hyaluronová kyselina (HA)

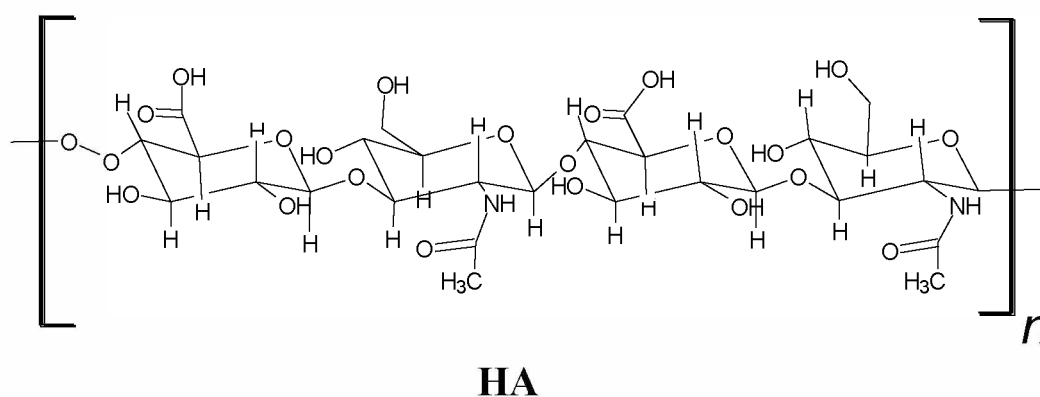
2.1.1 Obecná charakteristika

Kyselina hyaluronová je přírodní lineární polysacharid, který se v biomedicínském oboru široce používá, protože se jedná o biokompatibilní a netoxický polymer s velkou afinitou k vodě. Kromě toho přítomnost několika karboxylových a hydroxylových skupin v molekule HA činí z kyseliny ideálního kandidáta pro chemickou modifikaci. HA se přirozeně vyskytuje téměř ve všech živých organismech. V živých organismech se kyselina hyaluronová nachází ve formě sodných, draselných a vápenatých solí. Obecně se pro tyto soli používá název hyaluronan nebo hyaluronát.⁽⁴⁾

O kyselině hyaluronové se poprvé zmínili německý biochemik Karl Meyer a jeho asistent John Palmer v roce 1934. Během působení a výzkumu na Kolumbijské univerzitě se jim podařilo kyselinu izolovat ze sklivce kravského oka. V té době byla tato molekula pojmenována kyselina hyaluronová ve vztahu k její kyselé formě. Endre Balazs později vyvinul termín „Hyaluronan“ v roce 1986, aby se více začlenily různé formy, které molekula může mít, jako je kyselina nebo sůl.⁽⁵⁾

2.1.2 Chemická struktura

Z chemického hlediska, jak je evidentní z **obrázku 1.**, molekula kyseliny hyaluronové obsahuje ve své struktuře dvě stále se opakující sacharidové podjednotky složené z N-acetylglukosaminu a kyseliny glukuronové.⁽⁶⁾



Obrázek 1. Chemická struktura hyaluronové kyseliny

2.1.3 Biosyntéza a degradace kyseliny hyaluronové

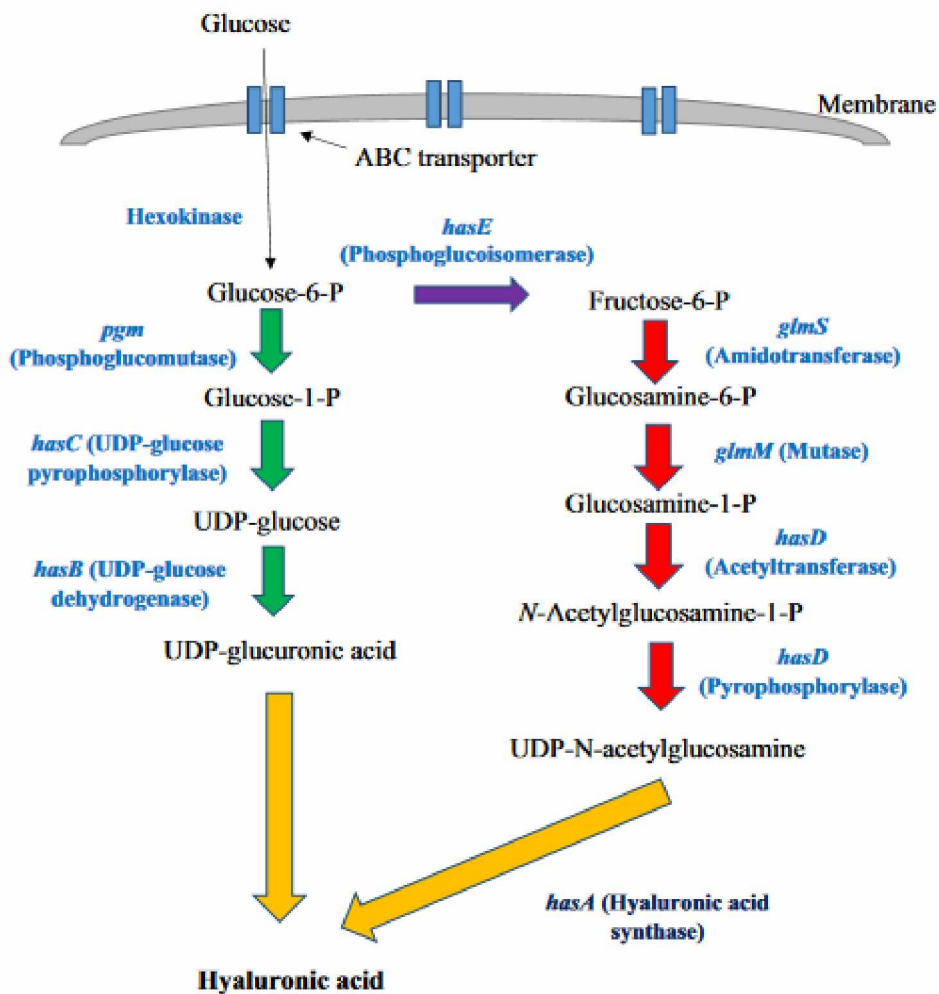
Biosyntéza HA probíhá v cytoplazmatické membráně živočišné buňky a to za pomoci enzymů hyaluronan syntáz (HAS), které se vážou na integrální membránové bílkoviny (IMB).⁽⁷⁾ Princip syntézy je založen na přidání obou složek disacharidu (Kyselina glukuronová a N-acetylglykasomin) k rostoucímu řetězci, pomocí nukleotidových cukrů uridindifosfát (UDF).⁽⁸⁾

Degradace hyaluronové kyseliny se účastní tři enzymy. První enzym hyaluronidáza rozštěpí vysokomolekulární řetězec kyseliny hyaluronové na oligosacharidy, které jsou dále rozštěpeny β -d-glukuronidázou a β -N-acetylhexosaminidázou.⁽⁹⁾

2.1.4 Výroba hyaluronové kyseliny

Kyselinu hyaluronovou lze získat komerčně třemi způsoby: lidskými pupečníky, kohoutovými hřebeny a kmeny *Streptococcus* skupiny C.⁽¹⁰⁾

V dnešní době se kyselina hyaluronová vyrábí hlavně mikrobiální fermentací pomocí bakterií *Streptococcus*, zejména *Streptococcus zooepidemicus*, které jsou zbaveny všech patogenů a nemají žádné riziko pro člověka.⁽¹¹⁾ Obě dvě složky jednotkového disacharidu kyselina D-glukuronová a N-acetylglukosamin jsou odvozeny od glukózy-6-fosfátu a fruktózy-6-fosfátu, dále se spojují pomocí uridindifosfátů. Na celkovou syntézu jednoho molu disacharidu se spotřebuje pět molů nukleosidtrifosfátů (3 ATP a 2 UTP), dva moly glukózy a jeden mol acetyl koenzymu A (Acetyl-CoA).⁽¹²⁾ Největší problém u tohoto způsobu výroby spočívá v konkurenci mezi syntézou HA a růstem buněk o zdroj uhlíku. 80% zdroje uhlíku se spotřebuje k produkci kyseliny mléčné, která inhibuje syntézu HA. Tento problém se řeší přesměřováním produkce kyseliny mléčné na kyselinu octovou, která je doprovázena v další produkci ATP nezbytné pro syntézu HA.⁽¹³⁾ (viz. **Obrázek 2**)



Obrázek 2. Biosyntetická cesta kyseliny hyaluronové v *S. Zooepidemicus*⁽⁸⁾

2.1.5 Chemické modifikace

Ze struktury HA je zřejmé, že primárně lze provést chemickou modifikaci na hydroxylových nebo karboxylových funkčních skupinách. Kromě toho je možno získat funkční aminoskupinu deacetylací N-acetylu a oxoskupinu selektivní oxidací C6—OH. Chemická modifikace obvykle probíhá ve vodném prostředí. Organická rozpouštědla, zejména DMSO nebo DMF jsou používány, pokud je substituent velmi hydrofobní nebo jsou-li reálné obavy z hydrolyzy.^(14,15) Reakce karboxylových skupin HA s aminosloučeninami za přítomnosti karbodiimidů (často N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid hydrochlorid (EDC)) je jednou z nejpoužívanějších metod modifikace HA.^(16,17)

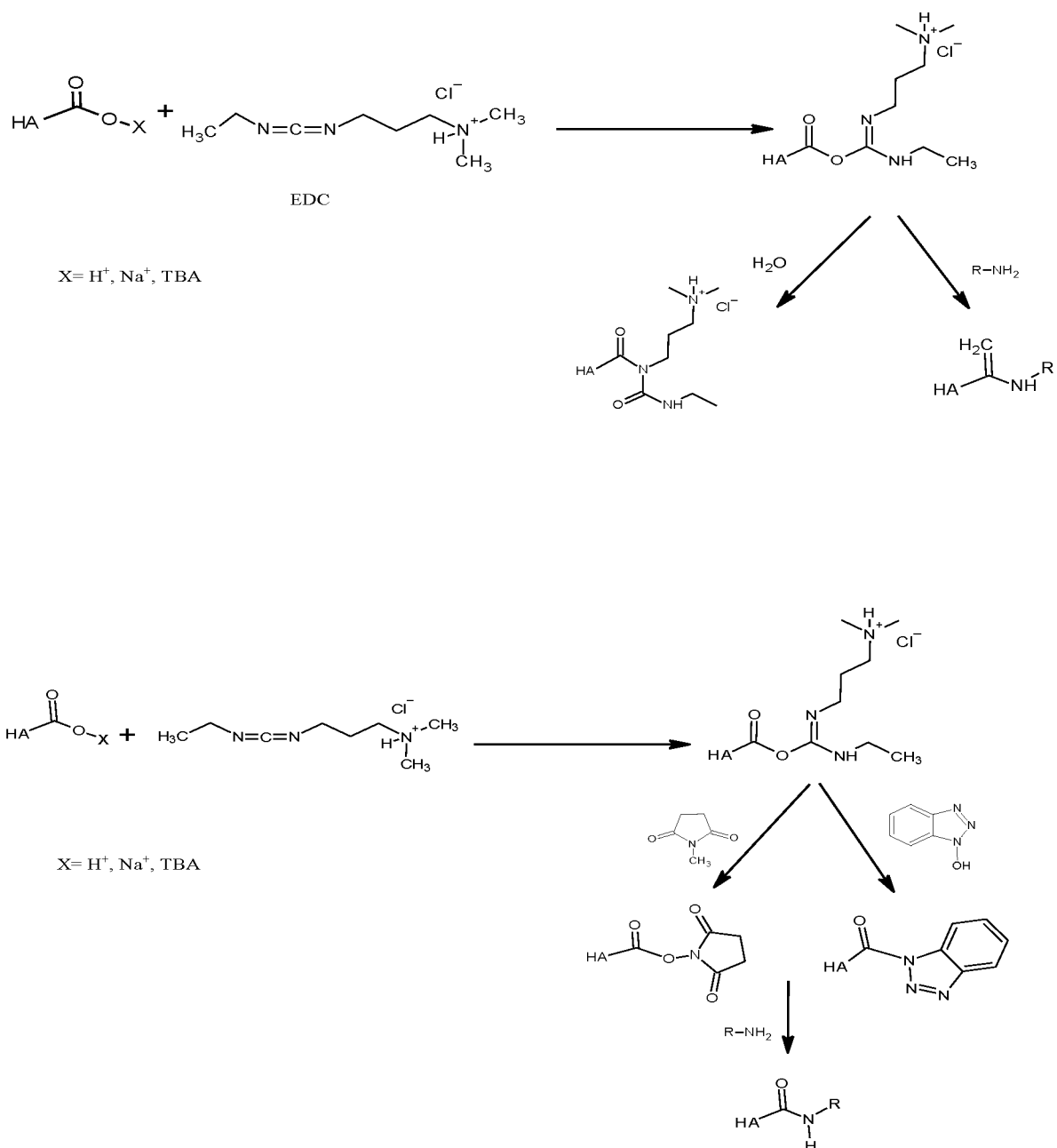


Schéma 1. Modifikace karboxylové funkční skupiny přípravou amidů

Značná pozornost byla věnována i esterifikaci kyseliny hyaluronové (modifikace karboxylové skupiny); v odborné literatuře lze nalézt mnoho postupů, při kterých dochází k tvorbě esterů HA. Estery byly připraveny reakcí HA s alkylhalogenidy (**Schéma 2a**), tosyláty (**Schéma 2b**), diazomethanem (**Schéma 2c**) nebo oxyrany (**Schéma 2d**).

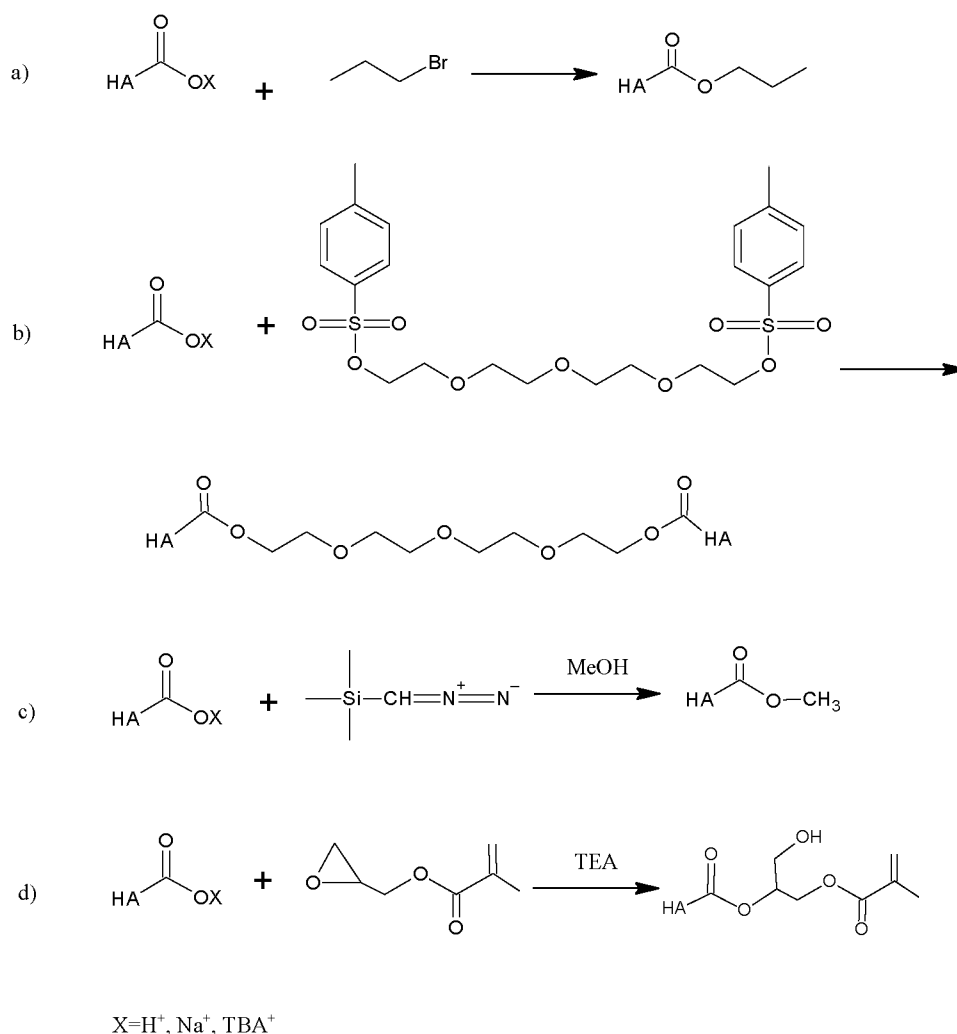


Schéma 2. Modifikace karboxylové funkční skupiny přípravou esterů

2.1.6 Funkce v organismu a využití

Kyselina hyaluronová je nezbytná pro správné fungování lidského těla. Díky svým unikátním vlastnostem nachází uplatnění v řadě oblastí, zejména v medicíně a farmacii. Některé funkce a použití kyseliny hyaluronové lze shrnout následovně.

Díky své biologické biodegradabilitě, biokompatibilitě a schopnosti vázat se na specifické membránové receptory se kyselina hyaluronová používá k diagnostice a léčbě různých typů rakoviny; působí tedy jako biologický nosič léčiv.⁽¹⁹⁾

- Je známo, že kyselina hyaluronová má velmi dobré hydratační vlastnosti (pojme přibližně tisícínásobek vody k své hmotnosti), a proto zvlhčuje tkáně v jejím okolí.⁽²⁰⁾

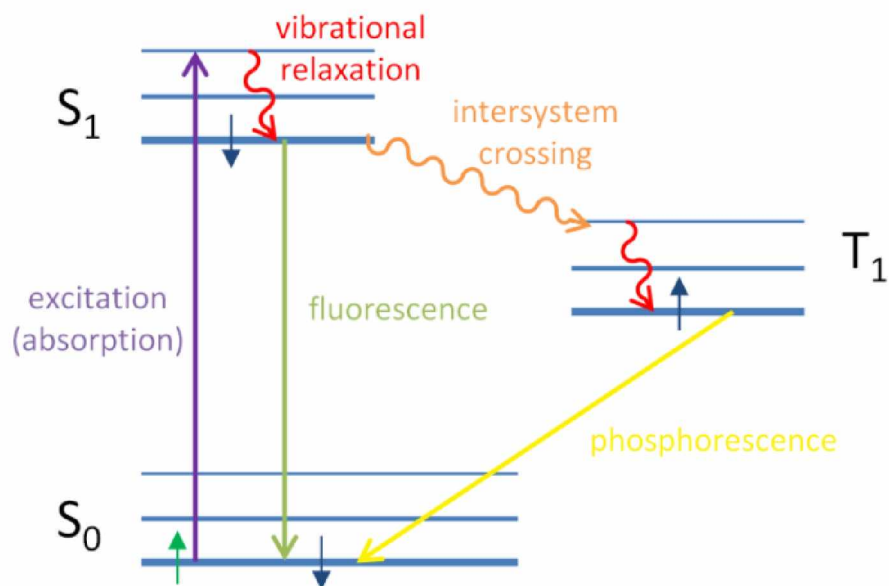
- Přispívá k zajištění flexibility a tažnosti tkání, ve kterých je přítomna.
- Zajišťuje transport iontů a dalších látek mezi buňkami a pomáhá udržovat stabilitu osmotického tlaku.⁽²¹⁾
- Kvůli své vysoké elasticitě se kyselina hyaluronová používá při očních nebo plastických operacích.⁽²²⁾
- Protože kyselina hyaluronová se přirozeně vyskytuje v synoviální tekutině, používá se také v ortopedii, protože může snížit tření mezi povrchy kloubů díky svým mazacím vlastnostem a může zmírnit bolest.⁽²³⁾
- Často se používá k hojení ran.⁽²⁴⁾
- V kosmetice lze kyselinu hyaluronovou použít k výplni vrásek a také jako takzvaný hydrolifting s hydratací tváří, krku nebo dekoltu.⁽²⁵⁾

2.2 Fluorescence

Jako fluorescence je označována zářivá deaktivace molekuly z jejího excitovaného singletového stavu do stavu základního. Excitovaná molekula může přeměnit absorbovanou energii i nezářivě na energii vibrační (teplo) nebo ji předat jiným molekulám. V důsledku tzv. vibrační relaxace je vlnová délka fluorescence vzhledem k absorpčnímu pásu více či méně bathochromně posunuta (Stokesův posun).⁽²⁶⁾

Elektronové stavy molekuly a přechodů mezi nimi uvádí Jablonského diagram (**Obrázek 3**), který popisuje procesy podílející se na tvorbě elektronového excitovaného singletového stavu, který odpovídá absorpci a následné emisi nebo-li fluorescenci.

Luminiscenci obecně dělíme na fluorescenci a fosforescenci. Rozdíl mezi nimi spočívá v mechanismu, jakým se molekula vrací do svého základního stavu. U fluorescence k emisi elektromagnetického záření dochází při přechodu mezi dvěma stavy téže multiplicity (obvykle dvěma singlety S_1-S_0). U fosforescence k emisi záření dohází při přechodu mezi dvěma stavy rozdílné multiplicity (triplet – singlet T_1-S_0) (viz. **Obrázek 3**). Proto fosforescence má delší dobu dohasínání ($\gg 10^{-8}$ s) než fluorescence (10^{-8} s).⁽²⁷⁾



Obrázek 3. Jablonského diagram⁽²⁸⁾

2.2.1 Fluorescenční markery používaných k modifikací HA

Organické fluorofory jsou široce používány v mnoha oblastech, především v biologii, biotechnologii a medicíně, např. využívají se k vývoji technologií pro diagnostiku rakovinných buněk.⁽²⁹⁾ Fluorofory jsou charakterizovány jejich UV/Vis absorpčních a fluorescenčních spekter, absorpčním molárním koeficientem a kvantovým výtěžkem.⁽³⁰⁾

V této práci jsem uvedl reakce kyseliny hyaluronové s nejčastěji používanými fluorescenčními značkami v oblasti medicíny a biologie. Fluorofory s excitačním a emisním spektrem v blízké infračervené oblasti tzv. NIR fluorofory představují rozsáhlou skupinu.⁽³¹⁾ Zatímco pro in vivo aplikace se používá jen několik jako jsou deriváty polymethinových cyaninových barviv (pentamethinové deriváty (Cy5) a indocyaninová zeleň)⁽³²⁾ a deriváty Bodipy.⁽³³⁾ Mezi dalšími fluorofory, které nepatří do skupiny NIR fluoroforů, se často používá pro in vivo aplikace deriváty fluoresceinu (FL). Mají dobré fotochemické vlastnosti, jako jsou vysoký molární koeficient a vysoký kvantový výtěžek.⁽³⁴⁾

2.3 Modifikace kyseliny hyaluronové fluorescenčními značkami.

Jak již bylo uvedeno výše, modifikací HA jsou vytvořeny kovalentní vazby navázáním fluorescenční značky na HA a to v důsledku reaktivity funkčních karboxylových

a hydroxylových skupin této kyseliny. Získané deriváty pak mohou být využity v lékařství, nanotechnologiích nebo v biologii. Dále v posledních letech se objevilo mnoho aplikací fluorescenčních derivátů kyseliny hyaluronové jak v medicíně (zejména její nepostradatelný přínos pro chirurgii očí), tak v kosmetice.^(1,2)

2.3.1 Imobilizace povrchu fluorescenčně modifikované kyseliny hyaluronové nanočásticemi zlata

Zlaté nanočástice (AuNP) již tři dekády nacházejí široké uplatnění v biologii, katalýze a medicíně, a to zejména díky rozličnosti jejich tvarů, velikostí a nenáročné přípravě. Na rozdíl od velkých nanočástic ukázaly AuNP s velikostí pod 2 nm neočekávaně vysokou cytotoxicitu k různým buněčným liniím. Např. systematické výzkumy ve vodě rozpustných AuNP stabilizovaných produkty TPP (z angl. two-photon photopolymerization) o velikosti částic 0,8–15 nm, testovaných na čtyřech druzích rakovinových buněk (karcinomu epitelu buňky děložního čípku (HeLa); rakovinových buněk melanomu (SK-Mel-28), myších fibroblastů (L929) a myších monocytů/makrofágů (J774A1)), které představují hlavní buněčné typy s bariérovou fagocytární funkcí, ukázaly, že nanočástice zlata s velikostí 1,4 nm vykazují vysokou cytotoxicitu srovnatelnou s cytostatikem Cysplatinum.^(35,36)

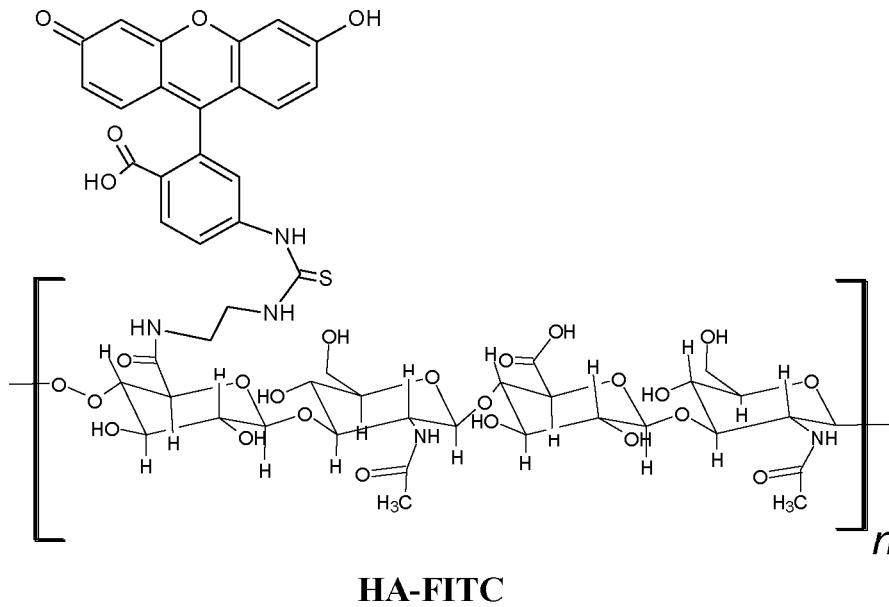
2.3.1.1 Kyselina hyaluronová–fluorescein (HA-FITC)

Fluorescenční derivát kyseliny hyaluronové s fluoresceinem, značený HA-FITC (Obrázek 4), našel uplatnění jako sonda pro sledování osudu hyaluronanu in vitro. Podle výsledků výzkumu, použití tohoto derivátu výrazně zlepšila vizualizaci pronikání substrátu přes kůži.⁽³⁷⁻⁴¹⁾

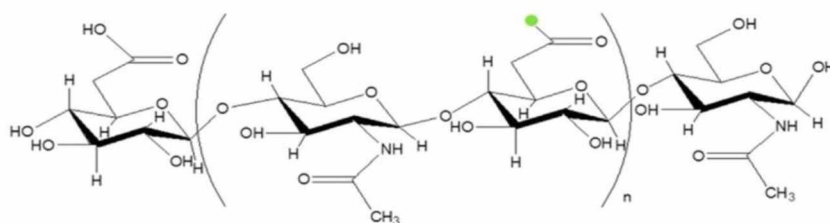
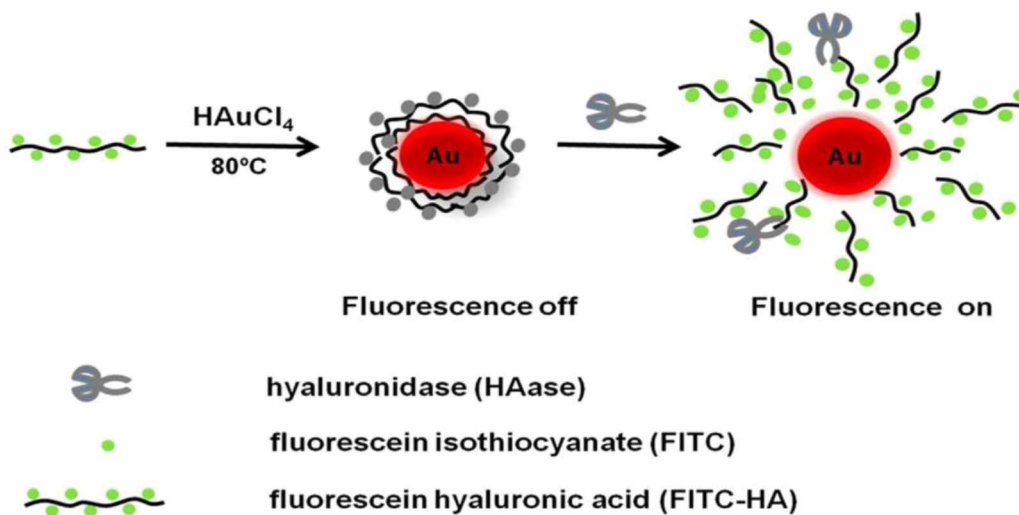
Je známo, že přenos fluorescenční rezonanční energie (FRET) je výkonnou analytickou technikou, která je široce používána pro studium detekce a molekulární interakce díky její vysoké citlivosti, specifčnosti a jednoduchosti.⁽⁴²⁾ V poslední době byla tato metoda vyvinuta a vylepšena do značné míry a to v důsledku rychlého vývoje nových materiálů, zejména nanomateriálů jako jsou fluorescenční tečky,⁽⁴³⁾ uhlíkové tečky,⁽⁴⁴⁾ Au-nanočástice,⁽⁴⁵⁾ uhlíkové nanotrubičky,⁽⁴⁶⁾ grafen.^(47, 48)

Cheng a jeho tým syntetizovali konjugát kyseliny hyaluronové-fluoresceinisothiokyanát HA-FITC (Obrázek 4) a vyvíjeli nový typ fluorescenčních nano-sond HA-FITC–AuNP (Obrázek 5). Postup přípravy nanočástic zlata, podle jejich studie, je velmi jednoduchý a sestává z jednostupňové syntézy, a to redukcí kyseliny chlorozlatité, kde HA-FITC slouží jako redukční i stabilizační činidlo. Autoři výzkumu využili výše uvedených FRET poznatků

k detekci enzymu hyaluronidázy pomocí připravených HA-FITC–AuNP nano-sondy na základě jeho specifické enzymatické degradace na kyselinu hyluronovou.⁽⁴⁰⁾ Příprava HA-FITC probíhala ve formamidu, v kterém byla HA rozpuštěna použitím dibutylcindilaurátu jako katalyzátoru reakce.⁽⁴⁹⁾



Obrázek 4. Chemická struktura HA-FITC



Obrázek 5. Schematické znázornění jednostupňové syntézy FITC – HA – AuNP⁽³³⁾

V další práci byla HA kovalentně spojená s fluoresceinem přes o-akrylát jako molekulový můstek. Syntéza byla provedena metodou PARP (přenos atomu radikálovou polymerací) ve dvou krocích. Nejprve hyaluronan zinečnatý reagoval s kyselinou 2-brom-2-methylpropionovou po její aktivaci pomocí *N*-Hydroxysukcinimidu (NHS).⁽⁵⁰⁾ (**Schéma 3**)

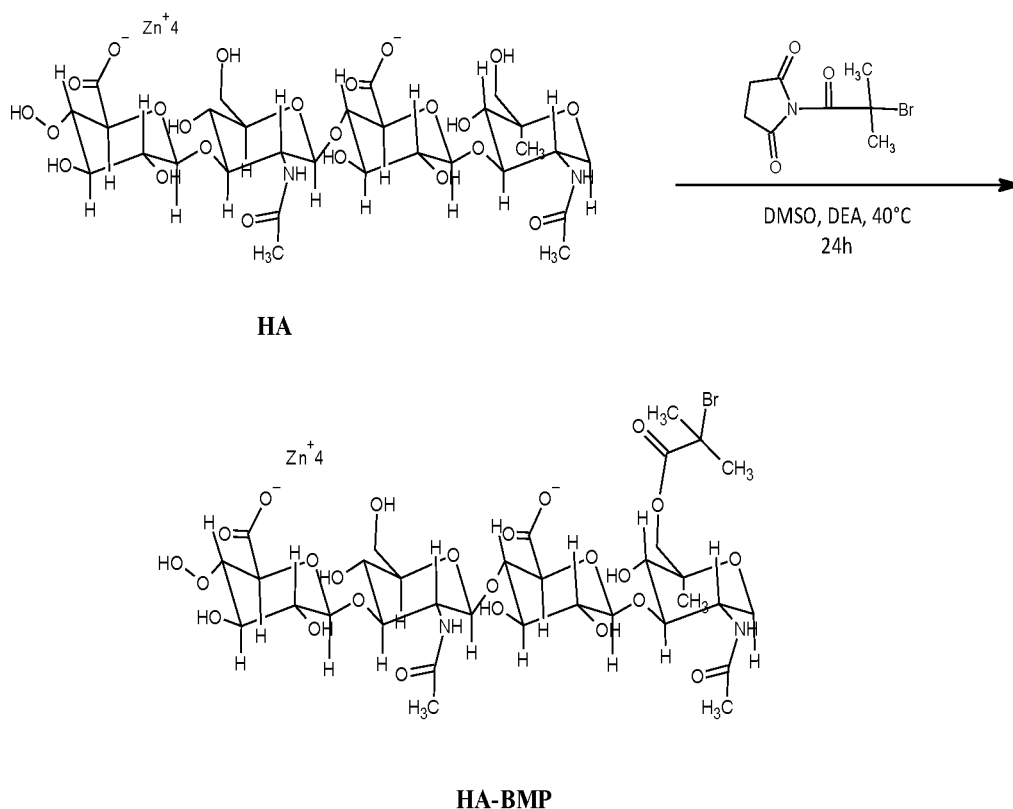
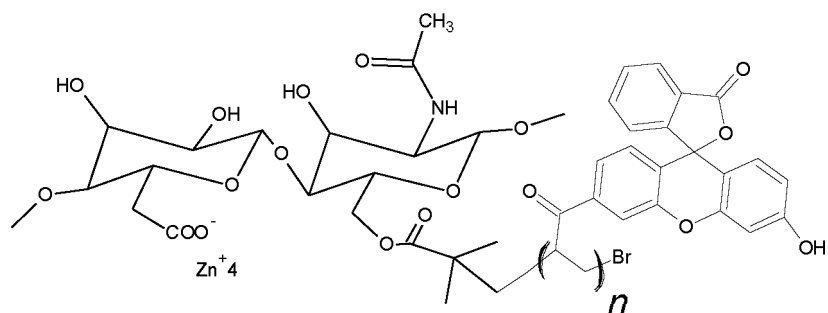


Schéma 3. První krok syntézy HA-Fluorescein-O-akrylátu

Následovalo homolytické štěpení halogenu komplexem přechodného kovu s nízkým oxidačním číslem, např. Cu^{+1} . Dále došlo k propagaci a její reverzibilní deaktivaci působením získaného Cu^{+2} . Katalyzátor polymerizace musí mít afinitu k halogenidu, ale nesmí docházet k vedlejším reakcím. V tomto případě byl používán komplex mědi, ve kterém byl Cu jako centrální kov a tris[2-(dimethylamino)ethyl] amin jako ligand.^(51, 52)

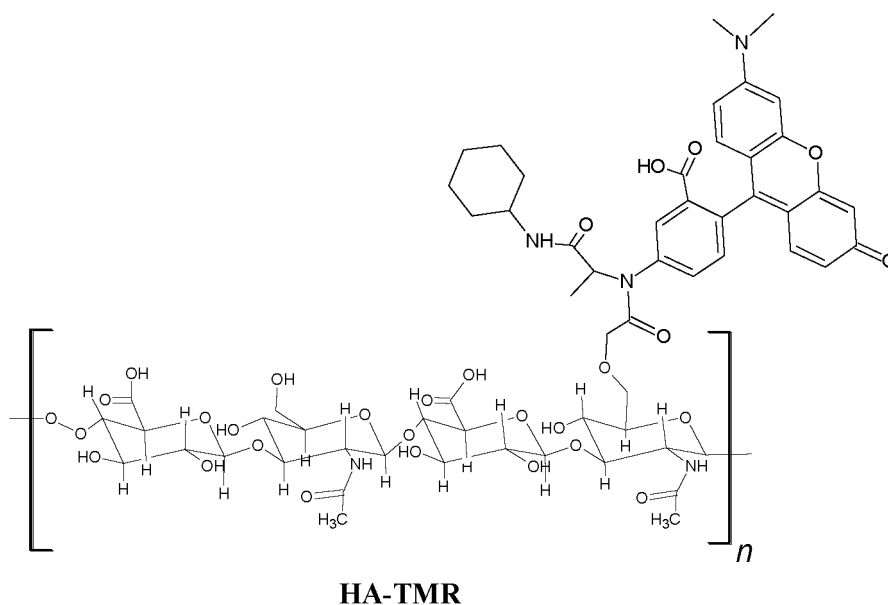


HA-Fluorescein-O-akrylát

Obrázek 6. Chemická struktura HA-Fluorescein-O-akrylát

2.3.1.2 Kyselina hyaluronová-Cy5.5 (HA- Cy5.5)

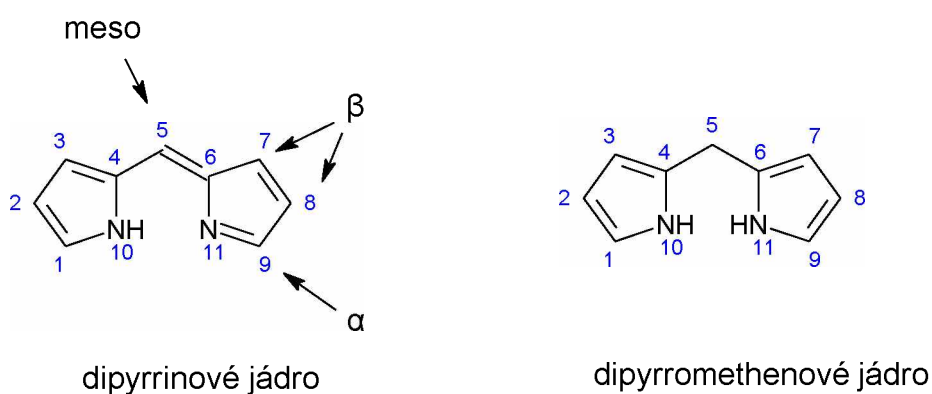
Modifikovaná HA pomocí pentamethinového derivátu cyaninových barviv (Cy5.5) je používána jako optická detekční metoda k sledování průběhu fototermální léčby nádoru ve formě nanonosiče.⁽⁵³⁾ Příprava nanonosiče je založena na jednoduchém principu spontánní emulgace organické látky do vnější vrstvy HA, která představuje vodní fázi.⁽⁵⁴⁾ Připravená nanočástice byla poté reagovala s fluorescenční značkou, která byla aktivovaná pomocí NHS.⁽⁵⁵⁾ (Schéma 4)

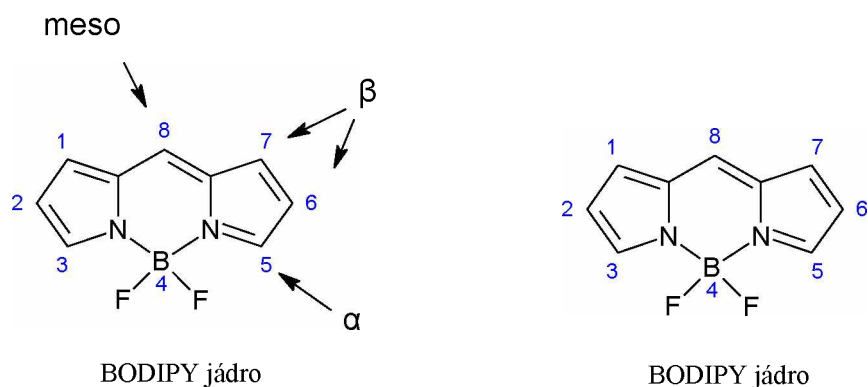


Obrázek 7. Chemická struktura HA-TMR

2.3.3 Kyselina hyaluronová-dipyrrromethen-boron (HA-BODIPY)

Mezi nejčastěji používaná barviva s vysokou fluorescenční intenzitou patří 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen (BODIBY).⁽⁵⁷⁾ Systém číslování IUPAC pro barviva BODIBY, který je odvozen z názvu a číslování s-indacenu, se liší od toho, které se používá pro dipyrrrometheny (derivátem s-indacenu). Proto se pro oba systémy používají termíny α -, β - a meso-pozice (schéma 1 - 2).⁽⁵⁸⁾





Obrázek 8. Číslování barviva BODIBY a dipyrromethenu podle IUPAC a používání termínů α -, β - a meso-pozice

2.3.3.1 Syntéza BODIPY

První syntéza byla popsána v roce 1968 Treibsem a Kreuzerem⁽⁵⁹⁾ (**Schéma 5**). Syntéza vychází z acylace 2,4-dimethylpyrrol (1), acetanhydridem (2) a fluoridem boritým jako katalyzátorem. Druhý krok zahrnuje kyselé katalyzovanou kondenzaci vzniklého pyrrol-2-karbaldehydu (3) se substituovaným pyrrolem za vzniku substituovaného dipyrromethanu (4). V posledním kroku derivát 4 následně reagoval s fluoridem boritým za tvorby BODIPY.⁽⁶⁰⁾

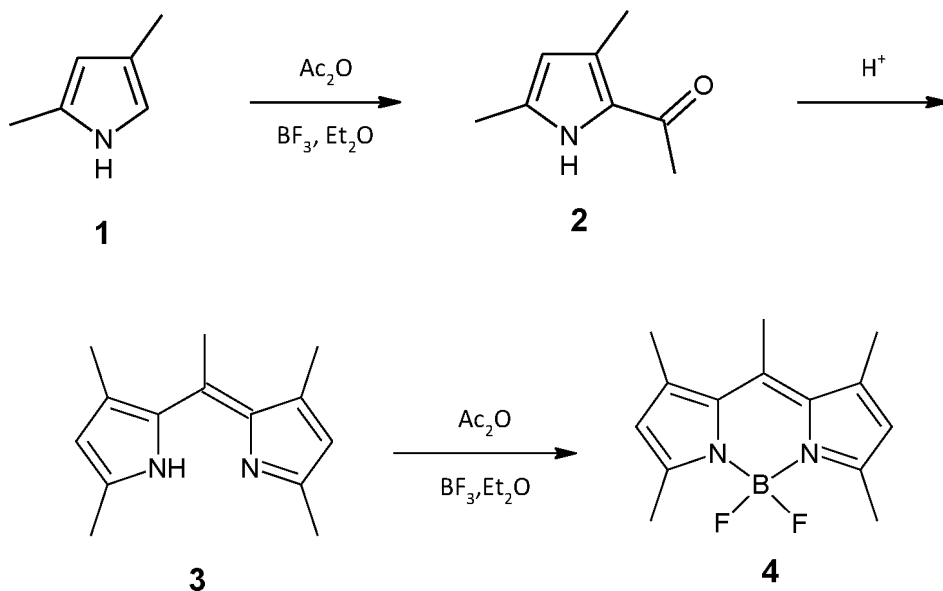


Schéma 5. Postup syntézy BODIPY

2.3.3.2 Příprava HA-BODIPY

Deriváty dipyrromethen-boron (BODIPY) jsou běžně užívány jako fluorescenční značky proteinů. Lze však v literatuře nalézt práce, ve kterých je používán BODIPY i jako fluorescenční značka HA. V publikaci z roku 1994 je popsán postup syntézy HA-BODIPY, který je zřejmý z následujícího schématu.⁽⁶¹⁾

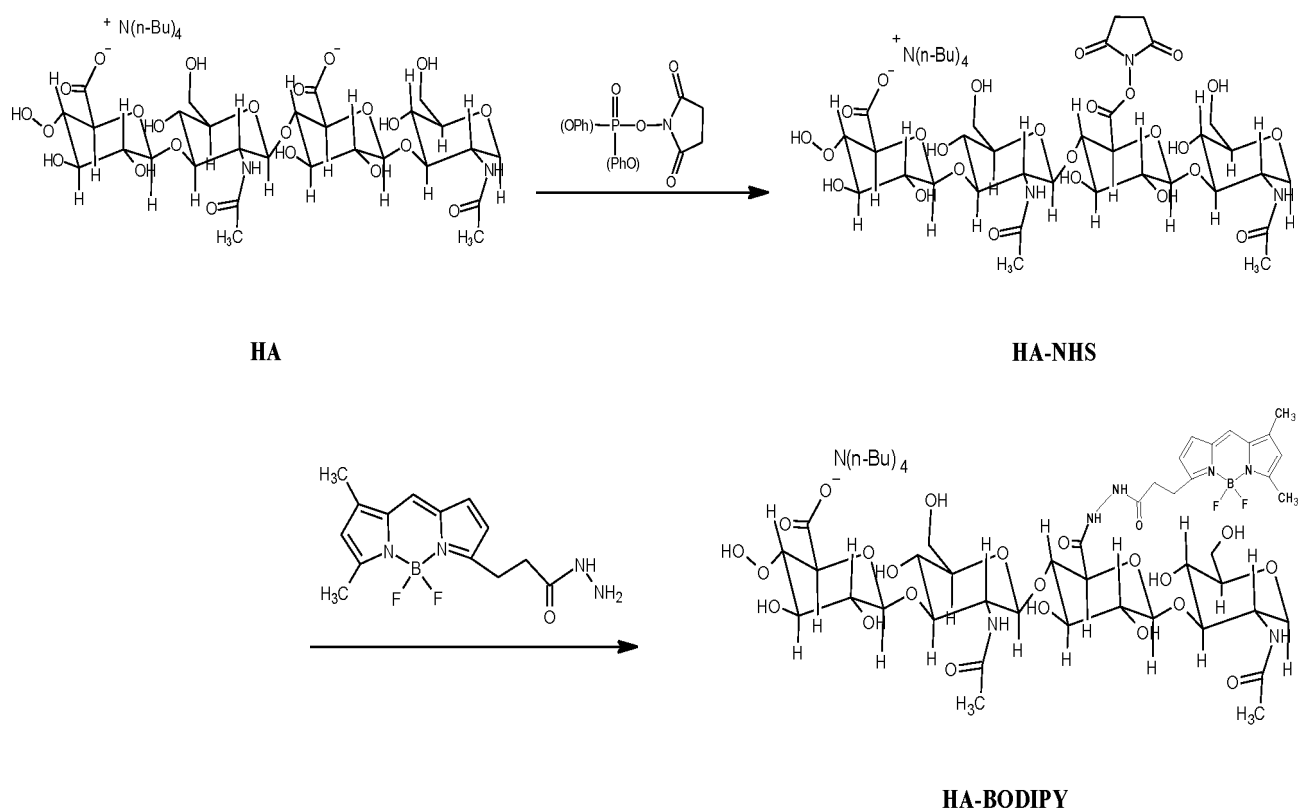


Schéma 6. Příprava HA-BODIPY

2.3.4 HA-Cypate

2.3.4.1 Patentovaná syntéza HA-Cypate

Firma CONTIPRO a.s. není světová jednička jen ve výrobě a distribuci hyaluronové kyseliny, ale je rovněž lídrem v problematice modifikace HA. Je nutno zde zmínit světový patent z roku 2017, kde firma CONTIPRO je majitelem.⁽⁶²⁾ Předmětem patentu je vývoj modifikovaného hyaluronanu pro přípravu nosičových systémů terapeutických látek detekovatelných v biologických systémech. Výsledky výzkumu jsou zároveň tématem

disertační práce.⁽⁶³⁾ Obsahem patentu a disertační práce je velká série modifikovaných látek, budu se však věnovat pouze fluorescenčním modifikacím kyseliny hyaluronové, protože je to součástí náplně mé bakalářské práce. Pro chemickou modifikaci HA byly použity dvě fluorescenční značky: cypate a nilská modř.

Fluorescenční derivát hyaluronanu-Cypate (HA-Cypate) byl připraven mnoha krokovou syntézou. Samotný Cypat byl připraven podle reakčního **schématu 7**, kde nejprve byla provedena kvarternizace 1,1,2-trimethylbenz[e]indolu (**5**) kyselinou 3-brompropanovou a v druhém kroku byl syntetizován cypate (**10**). Dále N-((1E,3E,5E)-5-(fenylimino)penta-1,3-dienyl)benzenamonium-chlorid (**7**) byl nejdřív acetylován za vzniku intermediátu (**8**) (**Schéma 7b**), ten dále reagoval s 1,1,2-trimethyl-3-(2-karboxyethan-1-yl)-[1H]-benzo[e]indolium-bromidem za vzniku cypate (**10**) (**Schéma 7c**).

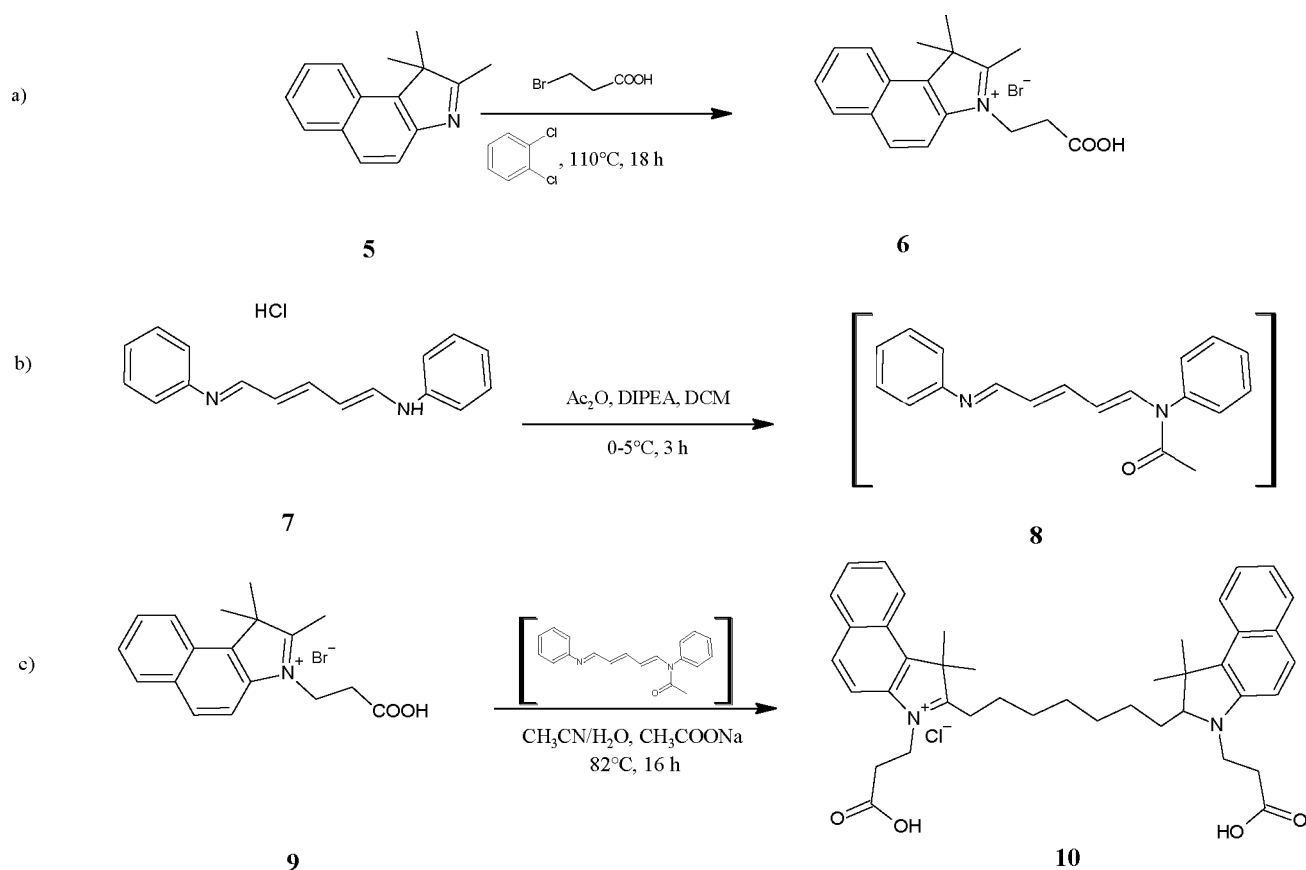


Schéma 7. Syntéza Cypate

V dalším kroku byla aktivována jedna ze dvou karboxylových skupin Cypate (**10**) působením di-(1H-imidazol-1-yl)methanonu (CDI) (**viz. Schéma 8**) za vzniku reaktivního

intermediátu *N*-acylimidazolu (**11**). Aby se zabránilo aktivaci obou karboxylových skupin (nežádoucí síťování HA) byl pro reakci použit pouze jeden ekvivalent CDI ve vztahu k jedné COOH skupině.

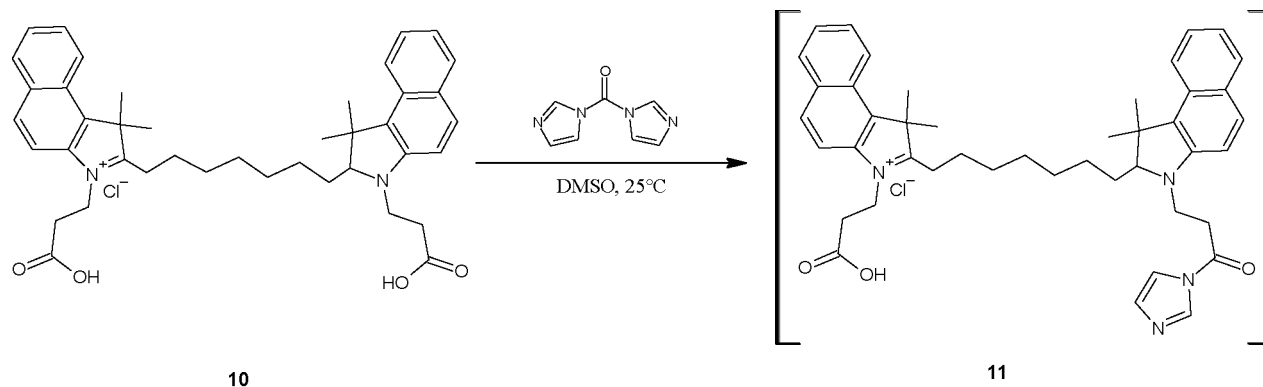


Schéma 8. Aktivace jedné ze dvou karboxylových skupin Cypate

V posledním kroku byl připraven HA-Cypate reakcí HA a Cypate:

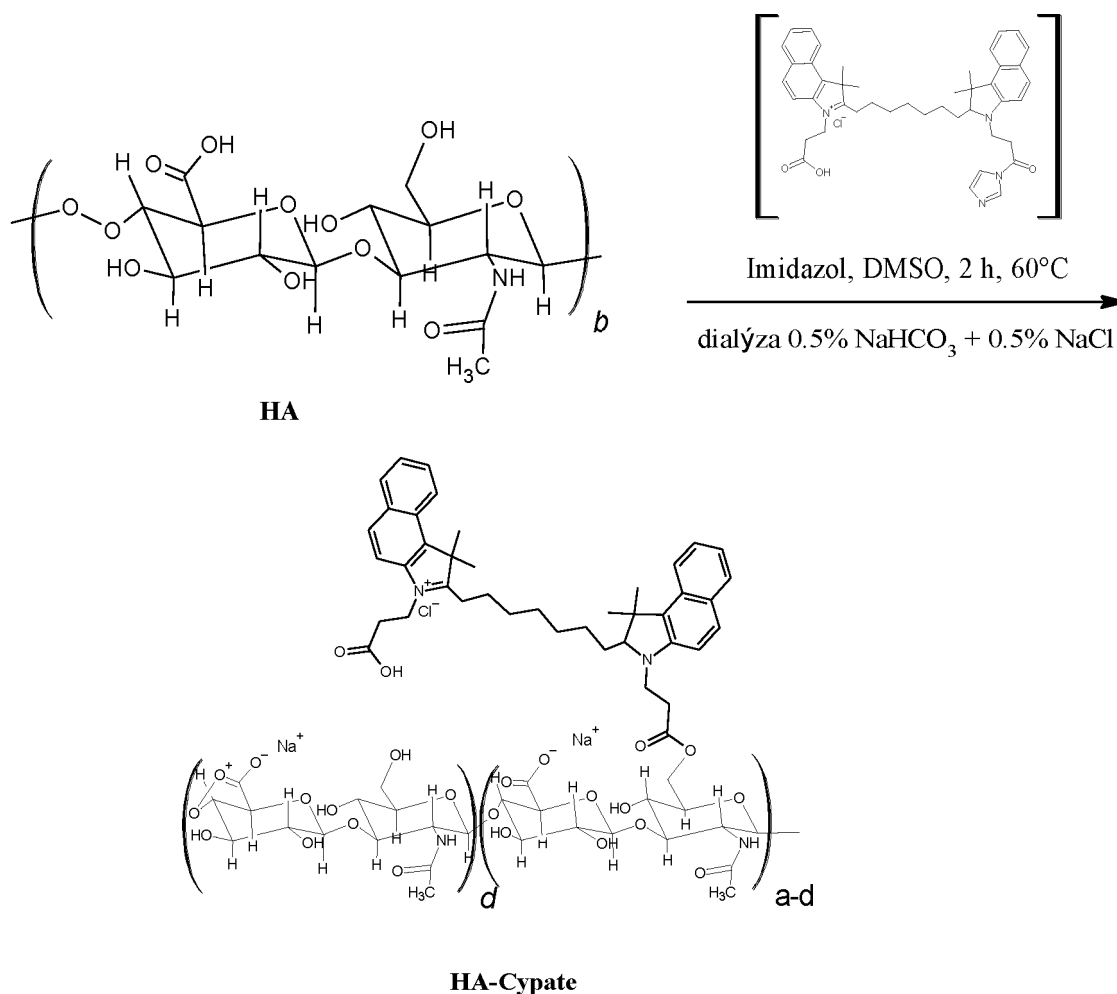


Schéma 9. Příprava HA-Cypate

Při modifikaci hyaluronanu fluorescenční nilskou modří (příprava HA-NM),⁶³ autoři zahájili svou syntézu přípravou oxidované formy HA (HA-OX), tzn. převedení primární hydroxylové skupiny na oxo skupinu, (Schéma 10). V dalším kroku HA-OX reagoval s nilskou modří za vzniku HA-NM podle reakčních podmínek uvedených na reakčním schématu 10.

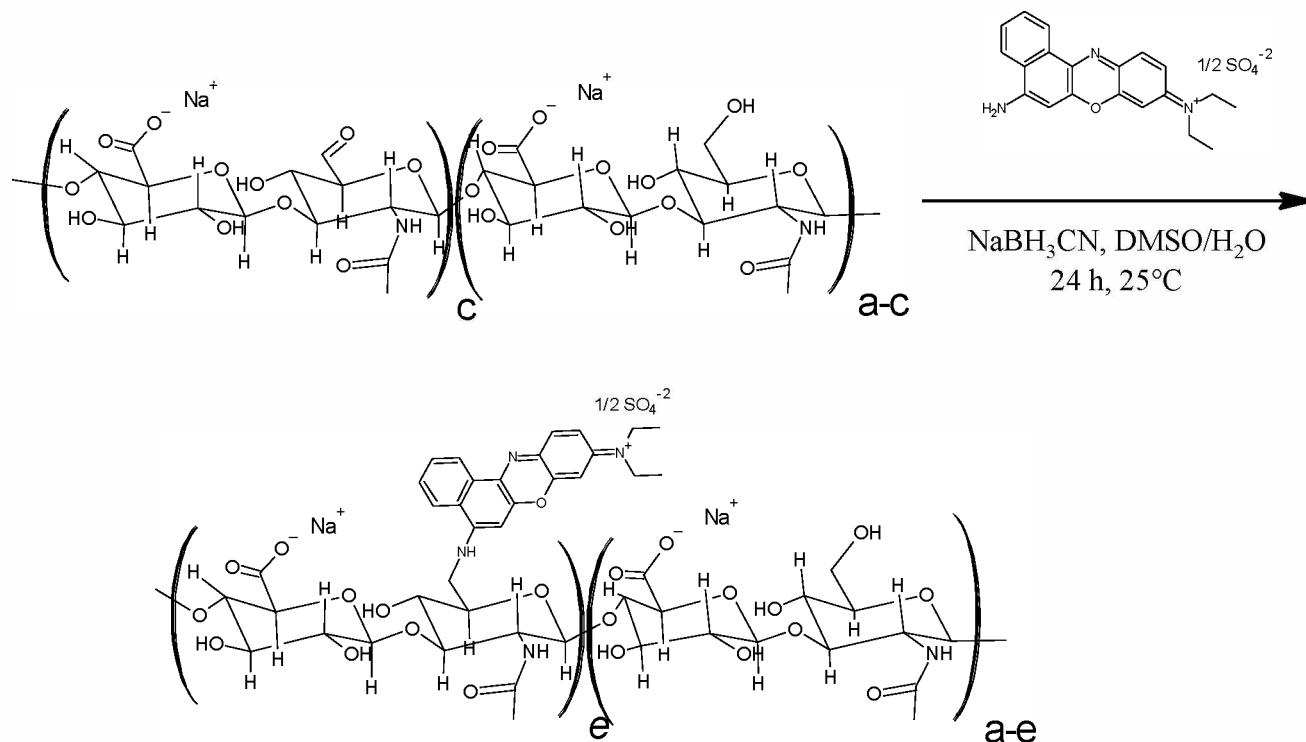


Schéma 10. Příprava HA-NM

2.3.4.2 Hydrofobizace hyaluronanu různými typy řetězců mastných kyselin

Pro přípravu amfifilních fluorescenčních derivátů schopných agregace ve vodném médiu a vytvoření fluorescenčně značených nosných systémů–polymerní micely, HA-Cypate a HA-NM byly dále modifikovány různými typy řetězců mastných kyselin:

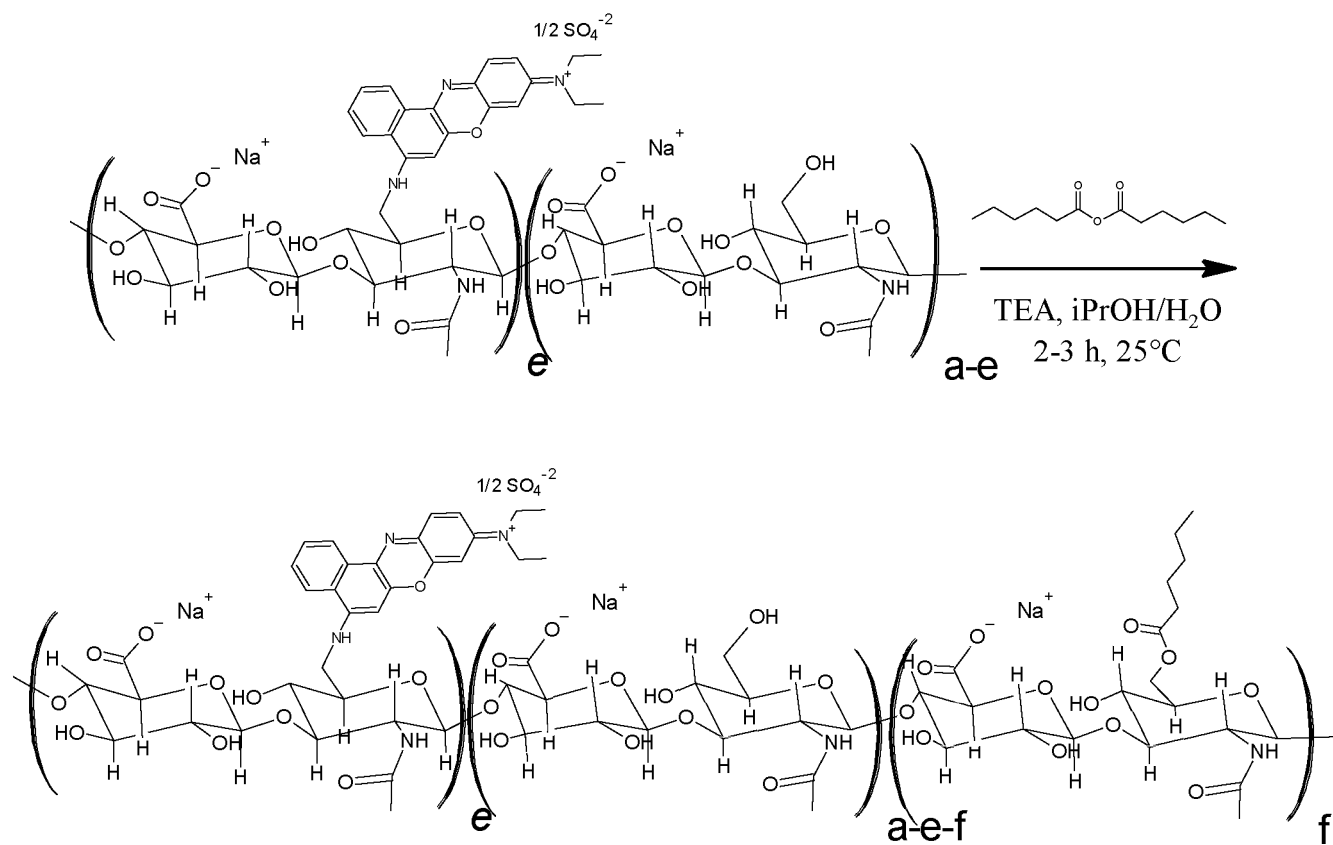


Schéma 11. Hydrofobizace hyaluronanu.

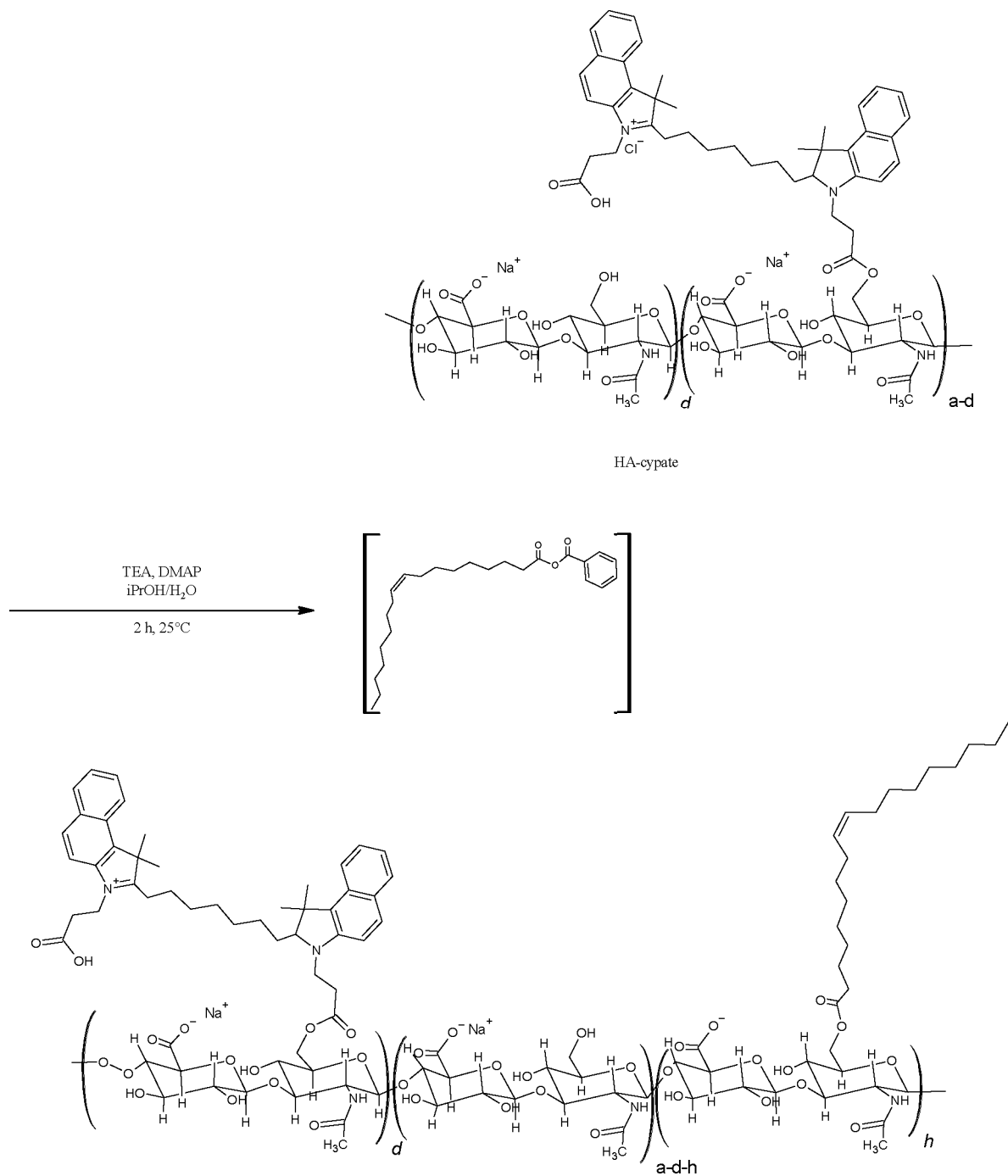


Schéma 12. Hydrofobizace hyaluronanu kyselinou olejovou

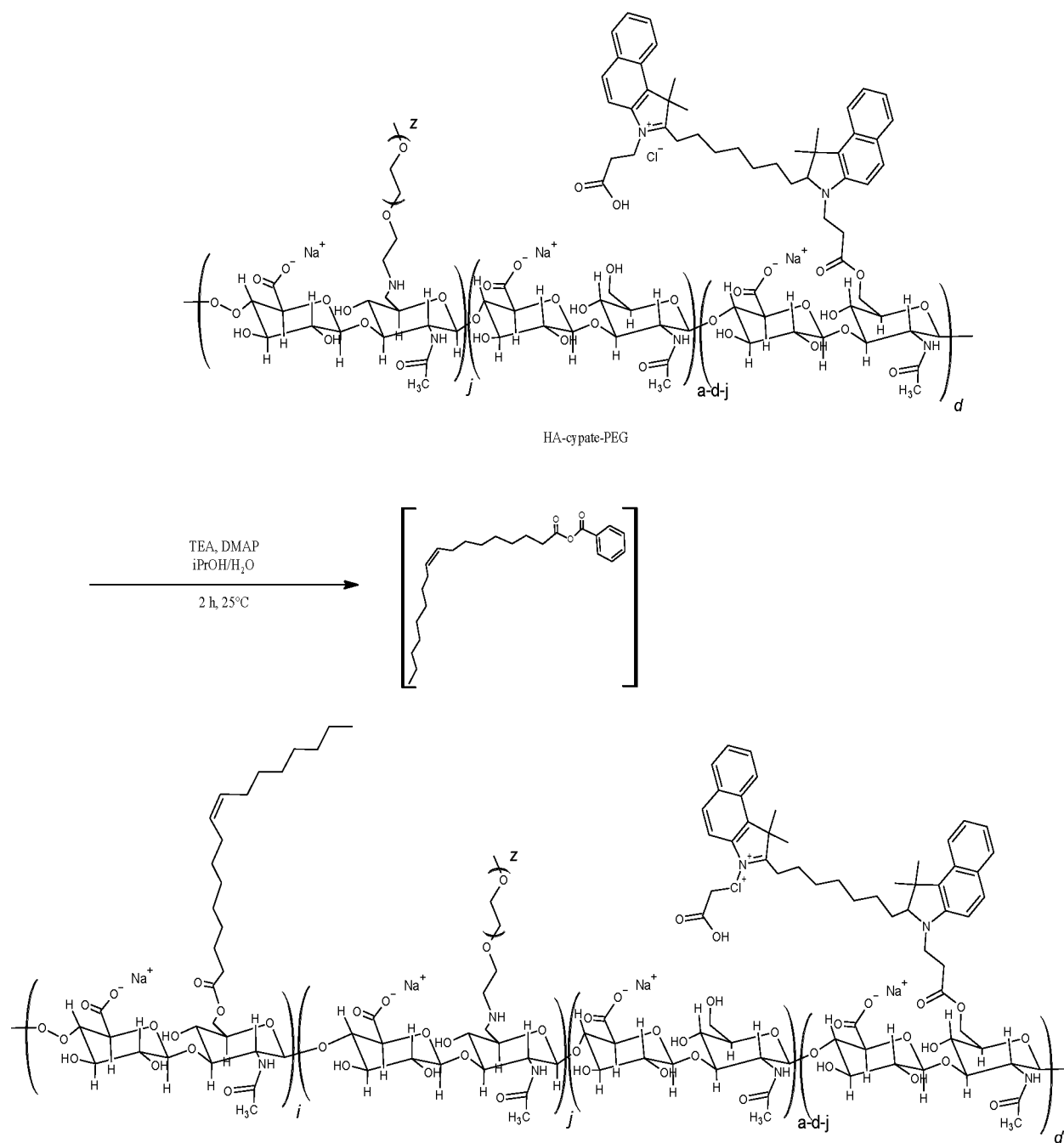


Schéma 13. Hydrofobizace hyaluronanu s vázaným cypate a PEG řetězci kyseliny olejové

3 Experimentální část

3.1 Použité chemikálie

Tabulka 1. přehled použitých chemikálií

Chemikálie	Kvalita	Dodavatel
Kyselina hyaluronová	p.a.	Contipro a.s.
DMF	p.a.	Penta
Pyren	98%	Fluka
Benzen	p.a.	Fluka
Trichlor-1,3,5-triazin	99%	Merck
Methanol	p.a.	Penta
1,4-Dioxan	p.a.	Lachema
Dichlorbenzen	99%	Fluka
HCl	36%	Penta
AlCl ₃	p.a.	Penta
Na ₂ CO ₃	p.a.	Penta

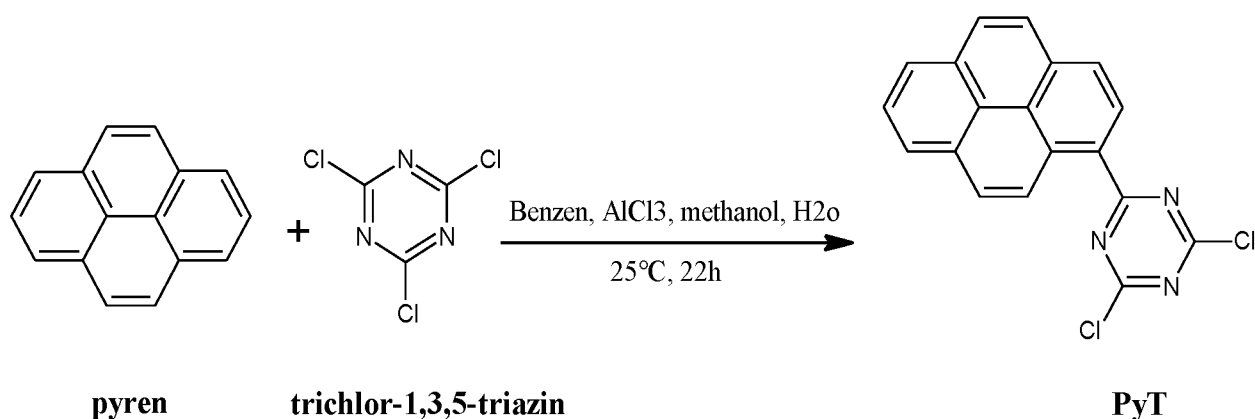
3.2 Použité přístroje a zařízení

- Absorpční spektra byla měřena na spektrofotometru UV/Vis Perkin-Elmer Lambda 35 při laboratorní teplotě.
- Fluorescenční spektra byla měřena na spektrofotometru Perkin-Elmer LS 55.
- Difraktogramy byly zaznamenávány na práškových vzorcích pomocí difraktometru D8 Advance (Bruker AXS, Německo) s Bragg-Brentanovým (Θ - Θ) goniometrem (poloměr 217,5 mm) vybaveným grafitovým monochromátorem zakřiveným sekundárním paprskem a scintilačním detektorem Na (Tl) I. Generátor byl provozován při 40 kV a 30 mA. Skenování bylo provedeno za pokojové teploty v rozmezí od 5 do 30 ° (2 θ) s krokem 0.02° a časem 8 s na jeden krok.
- Kinetika tepelného rozkladu hyaluronanu a jeho fluorescenční derivátů byla zkoumána pomocí termogravimetrie (TG) s různou rychlostí ohřevu (Netzsch 209 F3 instrument s Al₂O₃ kelímkem), rychlost ohřevu byla 10 °C/min s rychlosti záznamu dat 40 bodů na Kelvin. Měření bylo provedeno v CEITEC v Brně.

- ATR-FTIR spektroskopie byla provedena na přístroji Nicolet Impact 400 D FTIR spectrophotometer (Nicolet CZ, Praha, ČR) vybaveného ZnSe krystalem pro ATR-FTIR spektroskopii. Absorbance byla změřena jako funkce vlnočtu v rozmezí 4000-600 cm^{-1} s rozlišením 8 cm^{-1} . Měření bylo provedeno rovněž v CEITEC v Brně.
- Body tání byly stanoveny na bodotávku SMP 11, výrobce STUART

3.3 Příprava 2,4-dichlor-6-(1-pyrenyl)-1,3,5-triazinu (PyT)⁶⁴

Reakční schéma:

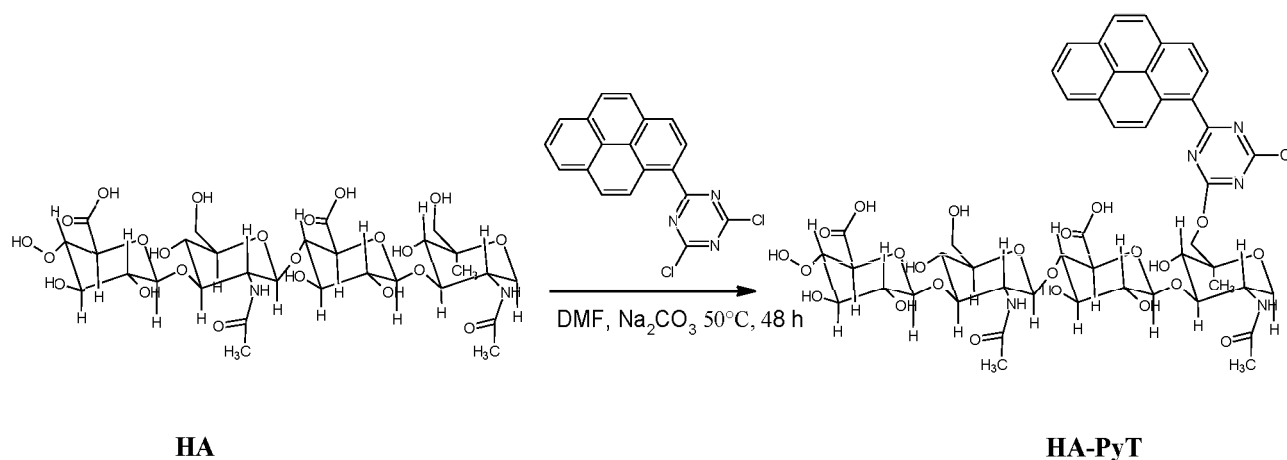


Postup:

PyT byl připraven z 5 g pyrenu a 5,55 g kyanurového chloridu (trichlor-1,3,5-triazin) Friedel-Craftovou syntézou v 100 g benzenového roztoku. Reakce probíhala za použití 5 g suchého AlCl₃ jako katalyzátoru reakce, který byl přidán po malých dávkách. Reakční směs byla míchaná při laboratorní teplotě po dobu cca 22 h. Poté bylo do chlazené reakční směsi (v ledové lázni) přidáváno po malých dávkách 50 ml methanolu. Vznikla zelenožlutá sraženina (filtrace na Büchnerově nálevce) byla v kádince společně rozmíchána se studenou vodou, kapkami smáčedla (Spolion 8) a 8 ml kyseliny chlorovodíkové. Poté byla zfiltrována a promyta methanolem. Po rekrystalizaci produktu z 100 ml dichlorbenzenu bylo získáno cca 7 g, což odpovídá cca 72 % teoretického výtěžku.

3.4 Příprava fluorescenčně označené kyseliny hyaluronové (HA-PyT)

Reakční schéma:



Postup:

Ve 100 ml varné baňce byly ve 20 ml dimethylformamidu (DMF) rozpuštěny 2 g kyseliny hyaluronové společně s 0,01 g fluorescenční značky (PyT) a uhličitanem sodným. Směs byla zahřívána při teplotě 50°C na dobu cca dva dny. Poté byla zfiltrována na Buchnerově nálevce. Modifikovaná kyselina hyaluronová po filtraci byla zahřívána v DMF, aby se odstranil zbytek nezreagované fluorescenční značky. Na tenkovrstvé chromatografii byla pozorována žlutá skvrna, která vykazuje stále přítomnost nezreagového PyT. Proto zbytek nezreagovaného PyT byl extrahován v Soxhletově extraktoru. Nečištěná modifikovaná kyselina byla vložena do střední části extraktoru. Do spodní části se připojovala baňka s DMF a k horní části byl zpětný chladič. Extrakce v Soxhletově extraktoru je založena na jednoduchém principu, kdy se rozpouštědlo zahřívá k varu, v chladiči se kondenzuje čistý DMF, který kape do střední části extraktoru, kde se probíhala extrakce PyT z nečisté tuhé látky. Celý cyklus probíhal tak dlouho, dokud byla detekována nezreagovaná fluorescenční značka (pomocí tenkovrstvé chromatografie). Stejným způsobem byly celkem připraveny 4 látky. (Tabulka 2)

Tabulka 2. Použité chemikálie k přípravě modifikované HA-PyT

PyT	HA	Na ₂ CO ₃	DMF	Produkt
0,005 g	2 g	0,145 g	20 ml	HA-PyT1
0,01 g	2 g	0,145 g	20 ml	HA-PyT2
0,02 g	2 g	0,28 g	20 ml	HA-PyT3

4 Výsledky a diskuze

4.1 Syntéza

Fluorescenční značka PyT byla připravena Friedl-Craftovou syntézou za použití AlCl_3 jako katalyzátoru reakce. Reakce proběhla cca 22 h při laboratorní teplotě. Za tu dobu bylo přidáno do reakční směsi 50 g methanolu za vzniku zelenožluté sraženiny, která byla zfiltrována a poté rekrystalizována dichlormethanem.

Příprava modifikované kyseliny hyaluronové pomocí PyT proběhla podle uvedeného postupu v kapitole 3.3, reakce byla celou dobu syntézy sledována pomocí tenkovrstevné chromatografie, kde byla první dvě hodiny detekována tmavě žlutá skvrna na chromatografické fólii, která se postupně zbarvila světle žlutě. Reakce byla prováděna tak dlouho, dokud nebyla žádná změna na tenkovrstvé chromatografii. Po ukončení této reakce byl produkt zfiltrován na Bücherové nálevce. Vzniklý filtrát ukazoval pod UV lampou vysokou fluorescenci.

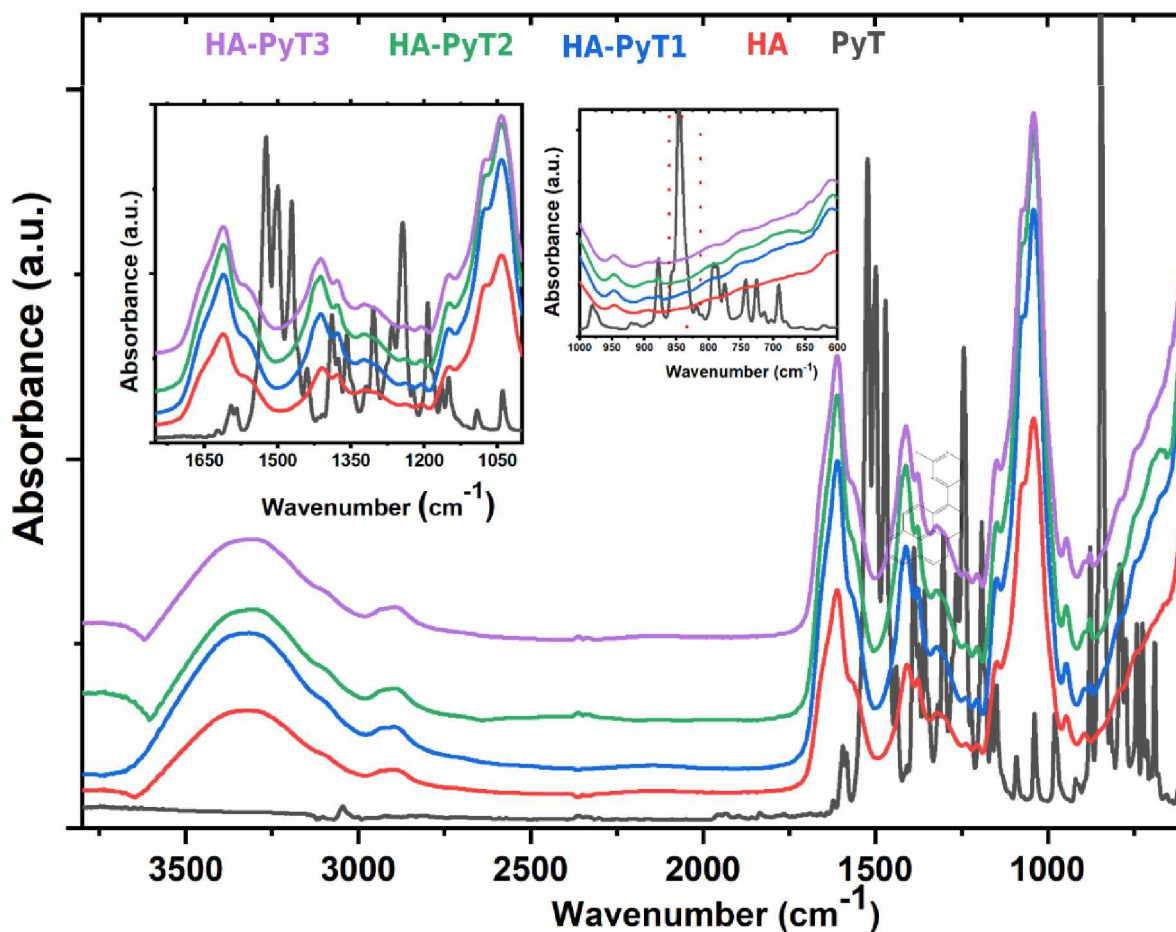
Filtrační koláč byl v kádince dále promíchán s DMF a znovu zfiltrován. Vzniklý filtrát pod UV lampou opět ukazoval vysokou fluorescenci. Další čištění jsem prováděl v Soxhletově extraktoru, kde produkt byl promyt čistým rozpouštědlem DMF na dobu cca. 4 dny. Poslední zkouška existence nereagovaného PyT jsem prováděl na tenkovrstevné chromatografii, kde se neukázala žádná fluorescence. Čistý produkt byl pak připraven k měření.

Difraktogramy byly zaznamenávány na práškových vzorcích pomocí difraktometru D8 Advance (Bruker AXS, Německo) s Bragg-Brentanovým (Θ - Θ) goniometrem (poloměr 217,5 mm) vybaveným grafitovým monochromátorem zakřiveným sekundárním paprskem a scintilačním detektorem Na (Tl) I. Generátor byl provozován při 40 kV a 30 mA. Skenování bylo provedeno za pokojové teploty v rozmezí od 5 do 30 ° (2 θ) s krokem 0.02° a časem 8 s na jeden krok.

Kinetika tepelného rozkladu hyaluronanu a jeho fluorescenční derivátů byla zkoumána pomocí termogravimetrie (TG) s různou rychlostí ohřevu (Netzsch 209 F3 instrument s Al_2O_3 kelímkem), rychlost ohřevu byla 10 °C/min s rychlostí záznamu dat 40 bodů na Kelvin. Měření bylo provedeno v CEITEC v Brně.

ATR-FTIR spektroskopie byla provedena na přístroji Nicolet Impact 400 D FTIR spectrophotometer (Nicolet CZ, Praha, ČR) vybaveného ZnSe krystalem pro ATR-FTIR spektroskopii. Absorbance byla změřena jako funkce vlnočtu v rozmezí 4000-600 cm^{-1} s rozlišením 8 cm^{-1} . Měření bylo provedeno rovněž v institutu CEITEC v Brně.

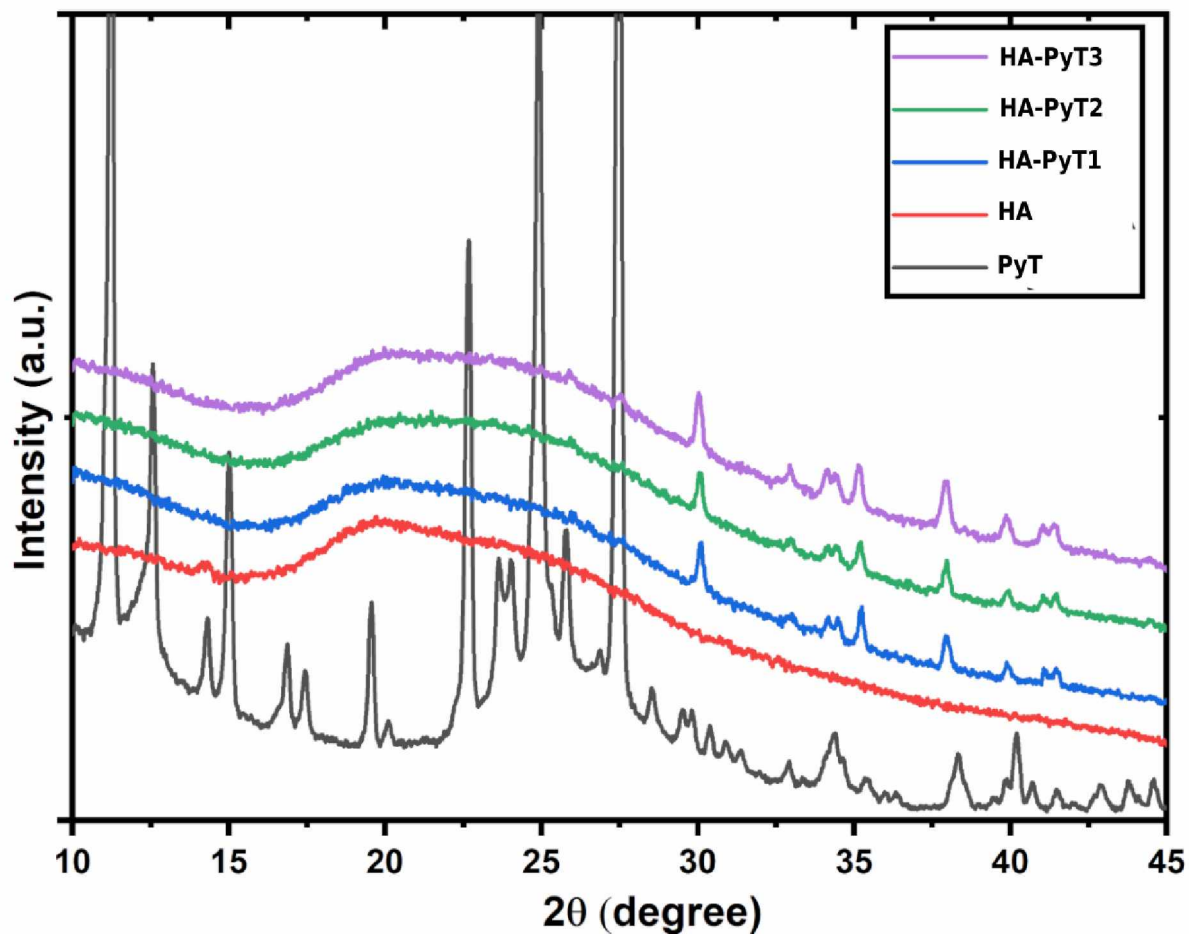
ATR-FTIR spektra



Obrázek 9. ATR-FTIR spektra hyaluronanu a jeho připravených derivátů HA-PyT1-3

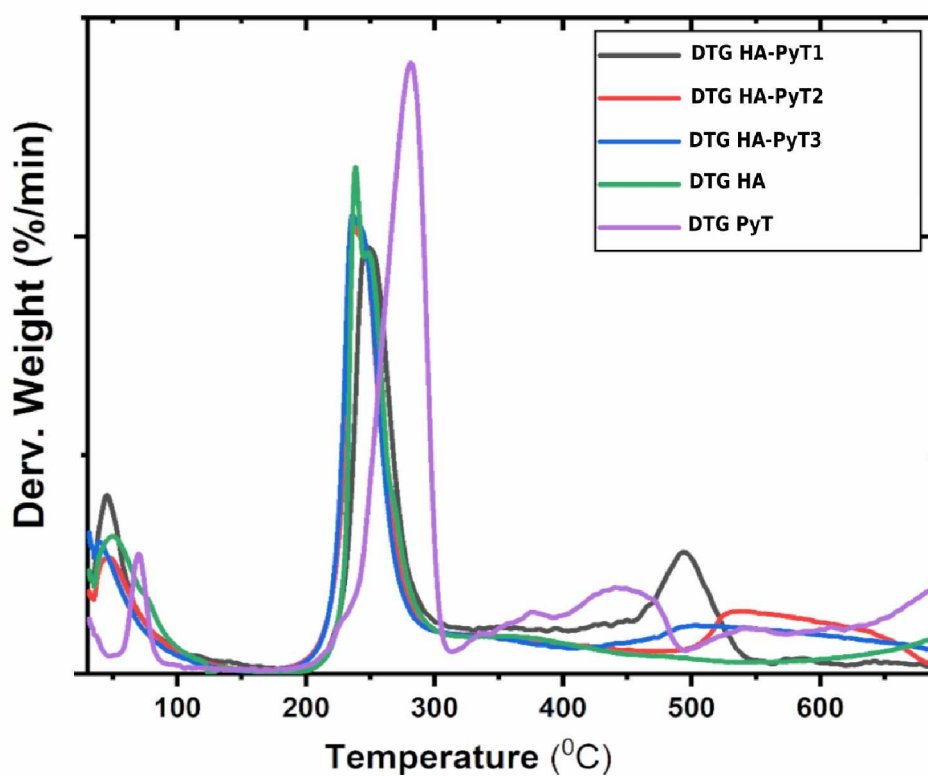
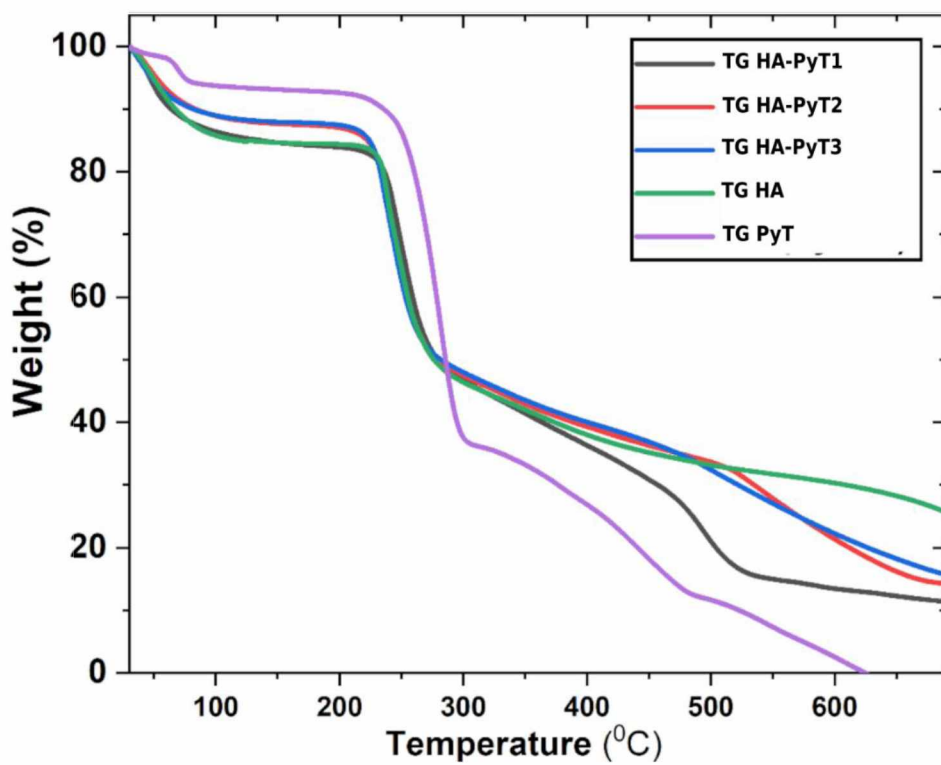
XRD analýza hyaluronanu a HA-PyT

XRD měření byla provedena za účelem získání podrobných informací o krystalografické struktuře původního hyaluronanu a jeho získaných derivátů. Z obrázku lze pozorovat pouze široký pás u $2\theta = 20^\circ$. Po roubování HA s různými poměry PyT byly pozorovány u HA-PyT nové pásy ($2\theta = 25,2, 31,1, 38,7$), odpovídající pásům C-Cl na triazinylovém kruhu (viz. **Obrázek 10**).



Obrázek 10. Reprezentativní XRD původního hyluronanu a HA-PyT1-3

U samotného hyluronanu bylo pozorováno, že asi 5% jeho hmotnosti bylo ztraceno při 100 °C, a v případě prášku HA byl úbytek hmotnosti 18% při 100 °C (stupeň I), je to především v důsledku odpařování vlhkosti v nanovlákněných rohožích. K tepelnému rozkladu HA dochází hlavně při teplotách mezi 200-300 °C s odpovídající ztrátou hmoty téměř 50,0 %. Při 245 °C dosahuje rychlost rozkladu maximum (viz. **Obrázek.11b**). Po chemické modifikaci HA pomocí PyT byla tepelná stabilita HA zlepšena ve srovnání s čistým hyluronanem.



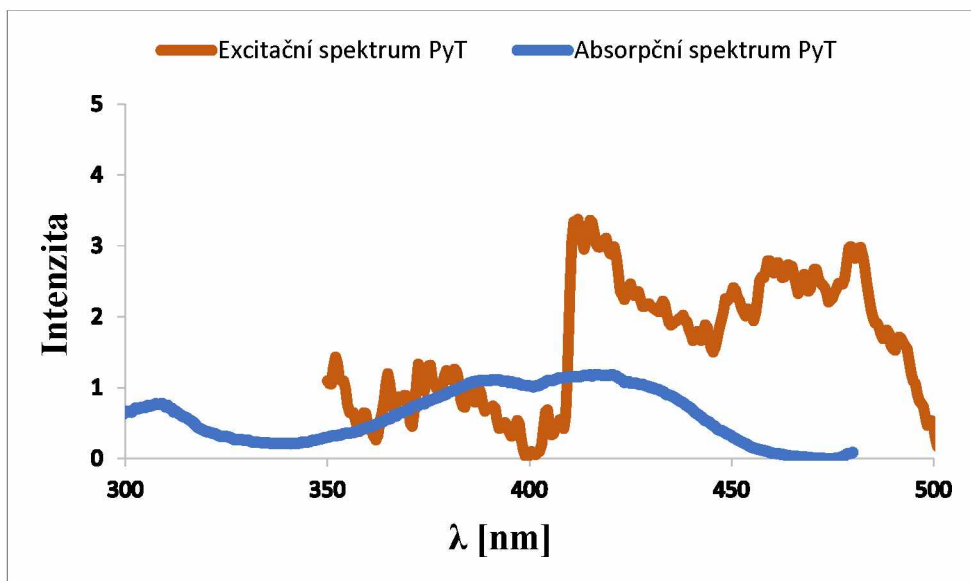
Obrázek 11 (a,b). Reprezentivní TG (a) a DTG (b) původního hyaluronanu a jeho derivátů HA-PyT1-3

4.2 Excitační a fluorescenční spektra

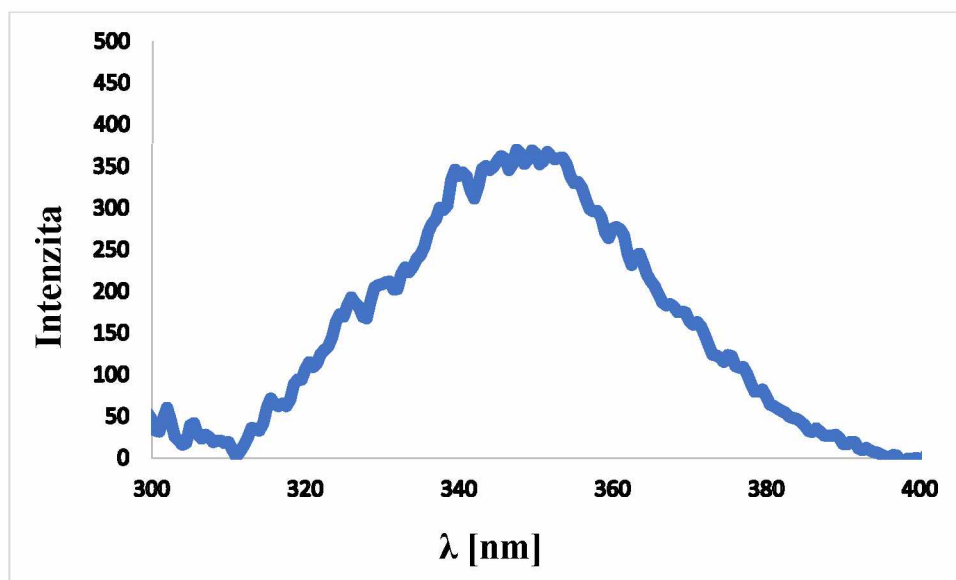
UV/Vis absorpční a fluorescenční spektra sloučeniny PyT byla měřena v roztoku (dioxan); díky tomu, že látka vykazuje fluorescence i v tuhé fázi byla měřena její excitační a fluorescenční spektra i v pevné fázi (prášek). Dále u všech připravených fluorescenčních derivátů HA byla měřena excitační a fluorescenční spektra pouze v pevné fázi. Excitační spektra všech fluorescenčních polymerů jsou identická, proto jako reprezentační spektrum je zde uvedeno pouze excitační spektrum HA-PyT1. **Obrázky 12-15** prezentují absorpční, excitační a fluorescenční spektra zkoumaných látek. Absorpční (v dioxanu) a excitační (v tuhé fázi) spektra PyT jsou tvořena ze tří pasů v oblasti 300-500 nm a 350-500 nm, v příslušném pořadí, s třemi maxima (viz. **Obrázek 12**). Substitucí jednoho atomu chloru sloučeniny PyT kyselinou hyaluronovou vedlo ke změně tvaru a pozice excitačních spekter získaných HA-PyT derivátů. Jak je zřejmé z obrázků **13 a 14**, ve srovnání s excitačním spektrem PyT, spektrum HA-PyT je tvořeno ze širokého pásu bez jakékoli vibrační struktury. Rovněž tvar fluorescenčního spektra HA-PyT1 je téměř totožný s tvarem fluorescenčního spektra PyT, ale jeho fluorescenční maximum je posunuto hypsochromně (asi o 149 nm) ve srovnání s fluorescenčním maximem PyT (viz. **Obrázek 15**). Podle výsledků fluorescenčních měření bylo zjištěno, že fluorescenční derivát s velmi vysokou intenzitou fluorescence lze získat již s využitím velmi malého množství fluorescenční značky. Zároveň bylo zjištěno, že fluorescenční intenzita významně klesá se zvýšením poměru PyT, to lze pozorovat na **obrázku 15**, kde HA-PyT1 a HA-PyT2 vykazují vyšší intenzity fluorescence než HA-PyT3. Bohužel nebylo dost času na přípravu dalších vzorků se zvýšením molárního poměru výchozího PyT, kde lze očekávat další snížení intenzity fluorescence.

Tabulka 3. Maximum excitačních a fluorescenčních spektra připravených látek

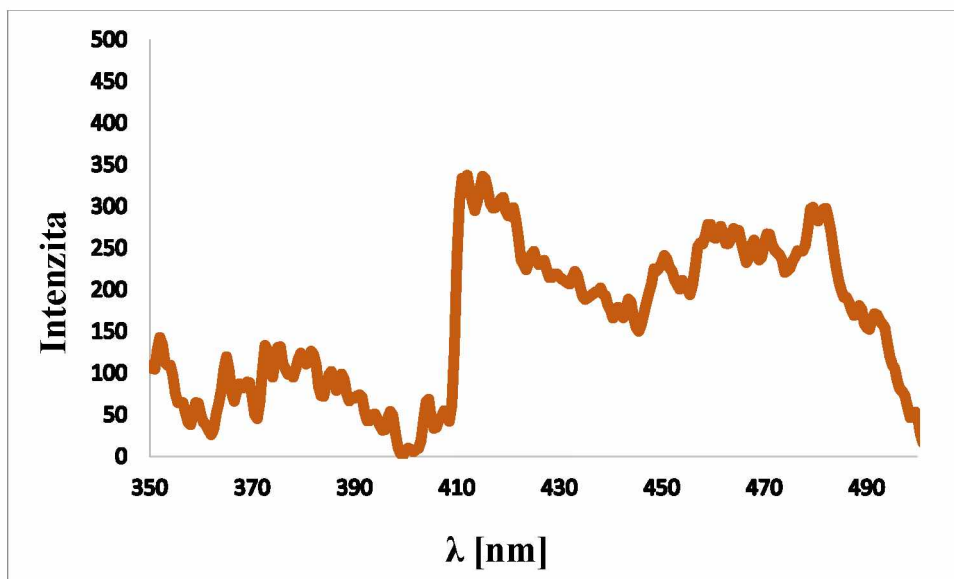
Látka	λ_E (nm)	λ_F (nm)
PyT	463/413	556
HA-PyT1	350	403
HA-PyT2	350	405
HA-PyT3	350	401



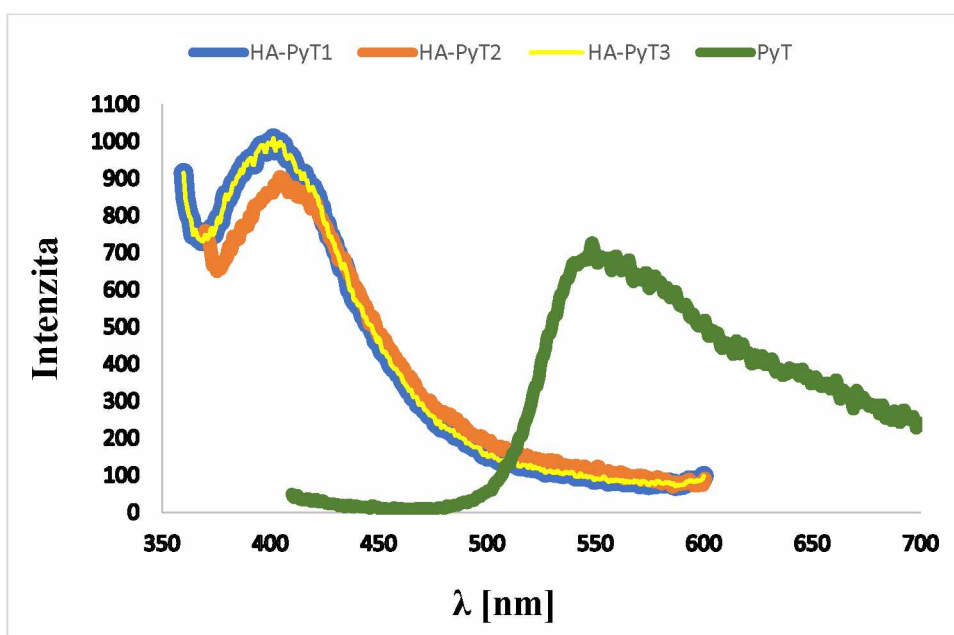
Obrázek 12. Excitační a absorpční spektra PyT



Obrázek 13. Excitační spektrum HA-PyT1 v tuhé fázi



Obrázek 14. Excitační spektrum PyT v tuhé fázi



Obrázek 15. Fluorescenční spektra PyT a HA-PyT1-3 v tuhé fázi

5 Závěr

V této bakalářské práci byla syntetizována fluorescenční značka 2,4-dichlor-6-(1-pyrenyl)-1,3,5-triazinu a to reakcí pyrenu s kyanurchloridem. Následně, nukleofilní substitucí atomu chloru na triazinylovém kruhu PyT kyselinou hyaluronovou byly připraveny požadované fluorescenční deriváty kyseliny hyaluronové. Fluorescenční deriváty HA byly připraveny v různém molárním poměru mezi HA a PyT v prostředí *N, N*-dimethylformamidu.

Struktura nových fluorescenčních derivátů HA byla charakterizována spektry ATR-FTIR, TGA a XRD analýzou. Kvůli časovým omezením struktura fluorescenčně značené HA nebyla potvrzena pomocí NMR měření. Pro zaznamenání změn v intenzitě fluorescence byly připraveny 3 vzorky fluorescenčního polymeru použitím různého molárního poměru výchozích látek. Fluorescenční spektra HA-PyT byla změřena v tuhé fázi. Na základě získaných dat lze konstatovat, že fluorescenční derivát s velmi vysokou intenzitou fluorescence může být získán již s využitím nejnižšího molárního poměru reaktantů. Zároveň bylo zjištěno, že fluorescenční intenzita významně klesá se zvýšením poměru výchozích látek.

6 Seznam literatury

- [1] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie 1*. Praha: Academia, **1992**. ISBN 80-200-0439-4.
- [2] KROISOVÁ, Dora. Biodegradovatelné polymery - úvod do problematiky. Liberec: Technická univerzita v Liberci, **2009**. ISBN 978-80-7372-468-9.
- [3] Goa; Karen L. a Benfield; Paul. Hyaluronic Acid, A Review of its Pharmacology and Use as a Surgical Aid in Ophthalmology, and its Therapeutic Potential in Joint Disease and Wound Healing. *Drugs*. **1994**, 47, 536–566.
- [4] Fišar; Zdeněk. Fluorescenční spektroskopie v neurovědách. Praha, **2003**. Karlová Univerzita, 1. lékařská fakulta UK.
- [5] Arrañeta; Eneko, Henry; Megan, Irwin ; Nicola J, Trotter; Johann, Perminova; Anastasia A. and Donnally; Ryan F. Synthesis and characterization of hyaluronic acid hydrogels crosslinked using a solvent-free process for potential biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*. **2018**, 181, 1194-1205.
- [6] Zhang; Min. Surface Modification of Ultra High Molecular Weight Polyethylene With Hyaluronan For Total Joint Replacement Application. Colorado, **2005**. Disertační práce (Ph.D). Colorado State University.
- [7] Gribbon; Philip, Heng ; Boon C. and Hardingham; Timothy E. The Molecular Basis of the Solution Properties of Hyaluronan Investigated by Confocal Fluorescence Recovery After Photobleaching. *Biophysical Journal*. **1999**, 77(4), 2210–2216.
- [8] Selyanin; Mikhail A., Khabarov; Vladimir N., Boykov; Petr Ya., Polyak; Felix. The History of Hyaluronic Acid Discovery, Foundational Research and Initial Use. *Hyaluronic Acid: Preparation, Properties, Application in Biology and Medicine*. 2015, 1–8.
- [9] Sze ; Jun Hui, Brownlie; Jeremy C. a Love ; Christopher A. Biotechnological production of hyaluronic acid: *a mini review*. **2016**, 3 Biotech, 6(1).
- [10] Jiang; Dianhua, Liang; Jiurong a Noble; Paul W. Hyaluronan as an Immune Regulator in Human Diseases. *Physiological Reviews*. **2011**, 91(1), 221-264.

- [11] Im; Jong-Hyuk, Song; Jung-Min, Kang; Jae-Hoon, Kang; Dae-Jung. Optimization of medium components for high-molecular-weight hyaluronic acid production by *Streptococcus* sp. ID9102 via a statistical approach. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. **2009**, 36(11), 1337-1344.
- [12] Liu; Long, Liu; Yanfeng, Li; Jianghua, Du; Guocheng a Chen; Jian. Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives. *Microbial Cell Factories*. **2011**, 10(1), 99.
- [13] Schiraldi; Chiara, Gatta; Annalisa La a De Rosa; Mario. Biotechnological Production and Application of Hyaluronan. *Department of Experimental Medicine, Faculty of Medicine, Second University of Naples*. **2010**.
- [14] Liu; L, Wang; M., Du; G. a Chen; J. Enhanced hyaluronic acid production of *Streptococcus zooepidemicus* by an intermittent alkaline-stress strategy. *Letters in Applied Microbiology*. **2008**, 46(3), 383-388.
- [15] Fallacara; Arianna, Baldini; Erika, Manfredini; Stefano a Vertuani; Silvia. Hyaluronic Acid in the Third Millennium. *Polymers*. **2018**, 10(7), 701.
- [16] Schanté; Carole E., Zuber; Guy, Herlinb; Corinne, Vandamme Thierry F. Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*. **2011**, 85(3), 469-489.
- [17] Oh; Eun Ju, Park; Kitae, Kim; Ki Su, Kim; Jiseok, Yang; Jeong-A, Kong; Ji-Hyun, Lee; Min Young, Hoffman; Allan S. a Hahn; Sei Kwang. Target specific and long-acting delivery of protein, peptide, and nucleotide therapeutics using hyaluronic acid derivatives. *Journal of Controlled Release*. **2010**, 141(1), 2–12.
- [18] Danishefsky; I a Siskovic; E. Conversion of carboxyl groups of mucopolysaccharides into amides of amino acid esters. *Carbohydrate Research*. **1971**, 16(1), 199–205.
- [19] Laurent; Torvard C, Laurent; Ulla B G a Fraser; J Robert E. Functions of hyaluronan. *Annals of the Rheumatic Diseases*. **1995**, 54(5), 429–432.

- [20] Yin; Tingjie, Wang; Yanyan, Chu; Xuxin, Fu; Ying, Wang; Lei, Zhou; Jianping, Tang; Xiaomeng, Liu; Jiyong a Huo; Meirong. Free Adriamycin-Loaded pH/Reduction Dual-Responsive Hyaluronic Acid-Adriamycin Prodrug Micelles for Efficient Cancer Therapy. *ACS Applied Materials & Interfaces*. **2018**.
- [21] Kwon; Seung Bin, Lee; Ghang Tai, Choi; Seong Jin, Lee; Na Kyeong, Park; Hyun Woo, Lee; Kwang Sik, Lee; Kun Kook, Ahn; Kyu Joong a An; In Sook. The Effect of Glycerin, Hyaluronic Acid and Silicone Oil on the Hydration, Moisturization and Transepidermal Water Loss in Human Skin. *Asian J Beauty Cosmetol*. **2013**, 11(4): 761-768.
- [22] Laurent; laurent C., Björk; Ingemar, Pietruszkiewicz; Adolph a Persson; Hakan. On the interaction between polysaccharides and other macromolecules. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1963**, 78(2), 351–359.
- [23] Sourdille; Philippe, Santiago; Pierre-Yves, Villain; Franck, Yamamichi; Mitsumo, Tahi; Hassane, Parel; Jean Marie a Ducournau; Yvette. Reticulated hyaluronic acid implantin nonperforating trabecular surgery. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*. **1999**, 25(3), 332–339.
- [24] Oliveira; Marcello Zaia, Albano; Mauro Batista, Namba; Mario Massatomo, da Cunha; Luiz Antônio Munhoz, de Lima Gonçalves; Renan Rodrigues, Trindade; Edvaldo Silva, Andrade; Lucas Ferrari a Vidigal; Leandro. Effect of hyaluronic acids as chondroprotective in experimental model of osteoarthritis. *Revista Brasileira de Ortopedia (English Edition)*. **2014**, 49(1), 62–68.
- [25] Price; Richard D, Berry; MG a Navsaria; Harshad A. Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*. **2007**, 60(10), 1110–1119.
- [26] Andre; Pierre. Hyaluronic acid and its use as a “rejuvenation” agent in cosmetic dermatology. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*. **2004**, 23(4), 218–222.
- [27] HPLC, hplc.cz: *Fluorescenční HPLC detektory* [online]. Aktualizace 2010 [cit. 29. duben **2012**]. Dostupné z WWW: <http://www.hplc.cz/Teorie/FL_detector.html>.

- [28] Eck; Michael. Performance enhancement of hybrid nanocrystal/polymer bulk heterojunction solar cells: aspects of device efficiency, reproducibility, and stability. Hamburg, **2014**. Uni Freiburg. Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau Technische Fakultät. Institut für Mikrosystemtechnik. Školitel Krüger; Michael a Zacharias; Margit.
- [29] Kukuła; Katarzyna, Kamińska; Iwona, Ortyl; Jolanta. Molekularne sondy fluorescencyjne w biologii, biochemii i biotechnologii. *Technical Issues*. **2015**, nr 4, 19-25.
- [30] Liu; Xiaogang, Xu; Zhaochao a Cole; Jacqueline Manina. Molecular Design of UV–vis Absorption and Emission Properties in Organic Fluorophores: Toward Larger Bathochromic Shifts, Enhanced Molar Extinction Coefficients, and Greater Stokes Shifts. *The Journal of Physical Chemistry C*. **2013**, 117(32), 16584–16595.
- [31] Zhang; Hua, Uselman; Ryan R. a Yee; Douglas. Exogenous near-infrared fluorophores and their applications in cancer diagnosis: biological and clinical perspectives. *Expert Opinion on Medical Diagnostics*. **2011**, 5(3), 241–251.
- [32] Luo; Shenglin, Zhang; Erlong, Su; Yongping, Cheng; Tianmin a Shi; Chunmeng. A review of NIR dyes in cancer targeting and imaging. *Biomaterials*. **2011**, 32(29), 7127–7138.
- [33] Hu; Rongrong, Lager; Erik, Aguilar-Aguilar; Angélica, Liu; Jianzhao, Lam; Jacky W. Y., Sung; Herman H. Y., Williams; Ian D., Zhong; Yongchun, Wong; Kam Sing, Pena-Cabrera; Eduardo, Tang; Ben Zhong. Twisted Intramolecular Charge Transfer and Aggregation-Induced Emission of BODIPY Derivatives. *The Journal of Physical Chemistry C*. **2009**, 113(36), 15845–15853.
- [34] Xiong; Xiong, Song; Fengling, Chen; Gengwen, Sun; Wen, Wang; Jingyun, Gao; Pan, Zhang; Yukang, Qiao; Bo, Li; Wenfang a Peng; Xiaojun. Construction of Long-Wavelength Fluorescein Analogues and Their Application as Fluorescent Probes. *Chemistry - A European Journal*. **2013**, 19(21), 6538–6545.
- [35] Pan; Yu, Neuss; Sabine, Leifert; Annika, Fischler; Monika, Wen; Fei, Simon; Ulrich, Schmid; Gunter, Brandau; Wolfgang a Jahnen-Dechent; Willi. Size-Dependent Cytotoxicity of Gold Nanoparticles. *Small*. **2007**, 3(11), 1941–1949.

- [36] Řezníčková; Alena, Novotná; Zdeňka, Kolská; Zdeňka, Ulbrich; Pavel a Švorčík; Václav. Příprava, funkcionalizace a roubování nanočástic ušlechtilých kovů na aktivovaný polymer. *Chem. Listy*. **2014**, 108, 865–874.
- [37] Yang; Jeong-A, Kim; Eung-Sam, Kwon; Jung Hee, Kim; Hyemin, Shin; Ji Hye, Yun; Seok Hyun, Choi; Kwan Yong, Hahn; Sei Kwang. Transdermal delivery of hyaluronic acid – Human growth hormone conjugate. *Biomaterials*. **2012**, 33(25), 5947–5954.
- [38] Mitsui; Yasuhiro, Gotoh; Masafumi, Nakama; Kenjiro, Yamada; Tetsu, Higuchi; Fujio a Nagata; Kensei. Hyaluronic acid inhibits mRNA expression of proinflammatory cytokines and cyclooxygenase-2/prostaglandin E2 production via CD44 in interleukin-1-stimulated subacromial synovial fibroblasts from patients with rotator cuff disease. *Journal of Orthopaedic Research*. **2008**, 26(7), 1032–1037.
- [39] Yokoo; Masaki, Miyahayashi; Yasunori, Naganuma; Takako, Kimura; Naoko, Sasada; Hiroshi a Sato; Eimei. Identification of Hyaluronic Acid-Binding Proteins and Their Expressions in Porcine Cumulus-Oocyte Complexes During In Vitro Maturation1. *Biology of Reproduction*. **2002**, 67(4), 1165–1171.
- [40] Cheng; Dan, Han; Weiye, Yang; Kuncheng, Song; Yang, Jiang; Mingdong a Song; Erqun. One-step facile synthesis of hyaluronic acid functionalized fluorescent gold nanoprobe sensitive to hyaluronidase in urine specimen from bladder cancer patients. *Talanta*. **2014**, 130, 408–414.
- [41] Yoneda; M, Shimizu; S, Nishi; Y, Yamagata; M, Suzuki; S, Kimata; K. Hyaluronic acid-dependent change in the extracellular matrix of mouse dermal fibroblasts that is conducive to cell proliferation. *Journal of cell science*. **1988**, (Pt 2):275-86.
- [42] Clegg; Robert M. Fluorescence resonance energy transfer. *Current Opinion in Biotechnology*. **1995**, 6(1), 103–110.
- [43] Noor; M. O a Krull, Ulrich J. Paper-Based Solid-Phase Multiplexed Nucleic Acid Hybridization Assay with Tunable Dynamic Range Using Immobilized Quantum Dots As Donors in Fluorescence Resonance Energy Transfer. *Analytical Chemistry*. **2013**, 85(15), 7502–7511.

- [44] W.L. Wei, C. Xu, J.S. Ren, B.L. Xu, X.G. Qu, *Chemical Communications*. 48. **2012**, 1284–1286.
- [45] J. Chen, Y. Huang, S.L. Zhao, X. Lu, J.N. Tian, *Analyst*. 137. **2012**, 5885–5890.
- [46] P. Tian, H.M. Zhao, M. Liu, Y.Q. Chen, X. Quan, *Analytica Chimica Acta*. 723. **2012**, 83–87.
- [47] Wang; Ying, Li; Zhaohui, Hu; Dehong, Lin; Chiann-Tso, Li; Jinghong a Lin; Yuehe. Aptamer/Graphene Oxide Nanocomplex for in Situ Molecular Probing in Living Cells. *Journal of the American Chemical Society*. **2010**, 132(27), 9274–9276.
- [48] E. Song, D. Cheng, Y. Song, M. Jiang, J. Yu, Y. Wang, *Biosens. Bioelectron.* 47 (**2013**) 445–450.
- [49] De Belder; Anthony. N. a Wik; K. Ove. Preparation and properties of fluorescein-labelled hyaluronate. *Carbohydrate Research*. **1975**, 44(2), 251–257.
- [50] Palumbo; Fabio. Salvatore, Pitarresi; Giovanna, Fiorica; Calogero, Matricardi; Pietro, Albanese; Antonella a Giammona; Gaetano. In situ forming hydrogels of new amino hyaluronic acid/benzoyl-cysteine derivatives as potential scaffolds for cartilage regeneration. *Soft Matter*. **2012**, 8(18), 4918.
- [51] Kwak; Yungwan a Matyjaszewski; Krzysztof. ARGET ATRP of methyl methacrylate in the presence of nitrogen-based ligands as reducing agents. *Polymer International*. **2009**, 58(3), 242–247.
- [52] Simakova; Antonina, Averick; Saadyah. E, Konkolewicz; Dominik a Matyjaszewski; Krzysztof. Aqueous ARGET ATRP. *Macromolecules*. **2012**, 45(16), 6371–6379.
- [53] Pusch; Annette, Boeckenhoff; Annika, Glaser; Tamara, Kaminski; Tim, Kirfel; Gregor, Hans; Michael, Steinfarz; Barbara, Swandulla; Dieter, Kubitscheck; Ulrich, Gieselmann; Volkmar, Brüstle; Oliver a Kappler; Joachim. CD44 and hyaluronan promote invasive growth of B35 neuroblastoma cells into the brain. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. **2010**, 1803(2), 261–274.

- [54] Liang; Xiaolong, Fang; Lei, Li; Xiaoda, Zhang; Xu a Wang; Fan. Activatable near infrared dye conjugated hyaluronic acid based nanoparticles as a targeted theranostic agent for enhanced fluorescence/CT/photoacoustic imaging guided photothermal therapy. *Biomaterials*. **2017**, 132, 72–84.
- [55] Min; Hyan. Su, Son; Sejin, Lee; Tae. Woong, Koo; Heebeom, Yoon; Hong. Yeol, Na, Jin. Hee, Choi; Yongseok, Park; Jae. Hyung, Lee; Jaeyoung, Han; Moon. Hee, Park; Rang-
[1] Woon, Kim; In-San, Jeong; Seo. Young, Rhee; Kyehan, Kim; Sun. Hwa, Kwon; Ick. Chan a Kim; Kwangmeyung. Liver-Specific and Echogenic Hyaluronic Acid Nanoparticles Facilitating Liver Cancer Discrimination. *Advanced Functional Materials*. **2013**, 23(44), 5518–5529.
- [56] Fei; Xuening, Shubei; Li, Lingyun; Cao, Baolian; Zhang a Miaozhuo; Yu. Multifunctional polymer drug loading system with pH-sensitive, fluorescent and targeting property. *Materials Science and Engineering: C*. **2017**, 77, 1151–1159.
- [57] Boens; Noe, Leen; Volker a Dehaen; Wim. Fluorescent indicators based on BODIPY. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41(3), 1130–1172.
- [58] Boens; Noël, Verbelen; Barm, Ortiz; María. J., Jiao; Lijuan, a Dehaen; Wim. Synthesis of BODIPY dyes through postfunctionalization of the boron dipyrromethene core. *Coordination Chemistry Reviews*. **2019**, 399, 213024.
- [59] Schmitt; Alexander, Hinkeldey; Babette, Wild; Mandy a Jung; Gregoe. Synthesis of the Core Compound of the BODIPY Dye Class: 4,4'-Difluoro-4-bora-(3a,4a)-diazas-indacene. *Journal of Fluorescence*. **2008**, 19(4), 755–758.
- [60] Treibs; A a Kreuzer; F.-H. Difluorboryl-Komplexe von Di- und Tripyrrylmethenen. *Justus Liebigs Annalen Der Chemie*. **1968**, 718(1), 208–223.
- [61] Karolin; Jan, Johansson; Lennart B.-A., Strandberg; Leif a Ny; Tor. Fluorescence and Absorption Spectroscopic Properties of Dipyrrometheneboron Difluoride (BODIPY) Derivatives in Liquids, Lipid Membranes, and Proteins. *Journal of the American Chemical Society*. **1994**, 116(17), 7801–7806.

[62] Contipro a.s. Fluorescent cypate conjugate of hyaluronic acid or salt thereof, hydrophobized conjugate, methods of preparation and use thereof. Inventors: Achbergerova; Eva, Smejkalova; Daniela, Huerta-Angeles; Gloria, Soucek; Karel, Hermannova; Martina a Velebny; Vladimir. WO 2017/108015 A1.

[63] Achbergerová; Eva. Development of modified hydrophobized hyaluronic acid useful for theranostics preparation. Zlín, **2018**. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická. Školitel Vícha; Robert.

[64] Kapusta; Peter, Fidler; Vlastimil, Nepraš; Miloš, Blachut; Tomáš, a Šeps Martin. 1-(dichloro-1,3,5-triazinyl)-pyrene- a new polarity probe. fluorescence microscopy and fluorescent probes. **1998**, (2), 133-139.